Série A, N° 4.599
N° d'ordre : 5.446

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Odile DURIEU-TRAUTMANN

1re THÈSE :

ETUDE DE L'ADAPTATION DE LA CYSTATHIONASE DU FOIE DE RAT SOUS L'INFLUENCE DE FACTEURS NUTRITIONNELS ET HORMONAUX

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 23 juin 1965 devant la Commission d'examen

MM. MONOD — *Président*
CLAUSER, Mlle CHATAGNER — *Examinateurs*

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1965

Série A, N° 4.599
N° d'ordre : 5.446

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Odile DURIEU-TRAUTMANN

1re Thèse :

ETUDE DE L'ADAPTATION DE LA CYSTATHIONASE DU FOIE DE RAT SOUS L'INFLUENCE DE FACTEURS NUTRITIONNELS ET HORMONAUX

2e Thèse :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 23 juin 1965 devant la Commission d'examen

MM. MONOD *Président*
CLAUSER } *Examinateurs*
Mlle CHATAGNER }

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, Rue Deparcieux, 29
PARIS — 1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen .. .. M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

BRELOT	T	Analyse supérieure
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés
PRÉVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
N	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN ...	T	Biologie anim. (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédiment. (Orsay)
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)
R. LUCAS	T	Recherches physiques
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC ...	T	Biologie végét. (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéral. et Cristallogr.
J.-P. MATHIEU .	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Phys. des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différ. et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
NORMANT	T	Synthèse organique
BÉNARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiol. végét. appliquée
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD ...	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN ...	T	Topologie algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Technique Mathém. de la Physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN ..	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale

Zamansky	T	Mathématiques générales
Lennuier	T	Physique (M.G.P.)
Rizet	T	Génétique (Orsay)
Routhier	T	Géologie appliquée
Mme Tonnelat.	T	Physique théorique
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C.)
Souchay	T	Chimie générale
Aigrain	T	Electrotechnique générale
Brusset	T	Chimie systématique
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme Chaix ..	T	Chimie biologique
Mme Hurel-Py.	T	Biologie végét. (P.C.B.)
Pannetier	T	Chimie générale
Brun	T	Mécanique théorique des fluides I
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay)
Mme Dubreil .	T	Mathématiques (Agrég.)
Mme Lelong ..	T	Mathémat. II (E.N.S.)
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.)
Cotte	T	Physique électricité
J.-E. Dubois ...	T	Chimie organique
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.)
A. Michel	T	Chimie minérale (Orsay)
Olmer	T	Energétique générale
Rouault	T	Electricité (Orsay)
Gauthier	T	Mécanique appliquée
Barchewitz ...	T	Chimie physique
Brossel	T	Physique atomique
Buser	T	Physiologie comparée
Camus	T	Physiol. végét.
Castaing	T	Physique II Thermod. (Orsay)
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie
Moyse	T	Physiol. végét. (Orsay)
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organ.
Possompes	T	Zoologie
Pullmann	T	Chimie quantique
Teillac	T	Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay)
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique
Ville	T	Econométrie
Willemart ...	T	Chimie (P.C.B.)
Dode	T	Chimie (Orsay)
Freymann	T	Recherches physiques
Guinochet	T	Biol. végétale (S.P.C.N., Orsay)
Rollet	T	Chimie minérale
Mlle Josien ...	T	Chimie (S.P.C.N.)
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
Arnoult	T	Electronique (Orsay)
Chapelle	T	Physique I (Orsay)
Delange	T	Mathématiques I (Orsay)
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay)
Germain	T	Mécanique théorique des fluides
G. Lucas	T	Géologie
Allard	T	Chimie physique
Berthelot	T	Physique des particules fondamentales (Orsay)
Bricard	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie
Friedel	T	Phys. des Solides (Orsay)
M. Julia	T	Etudes des Moléculaires naturelles complexes
Lender	T	Biologie anim. (S.P.C.N., Orsay)
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin ..	T	Electrochimie
Monod	T	Chimie du métabolisme
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay)
De Possel	T	Analyse numérique
Charlot	T	Chimie analytique
Lemée	T	Ecologie végétale (Orsay)
Guérin	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
M. Chatelet .	T	Chimie (P.C.B.)
Jean	T	Physique nucl. (Orsay)
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.)
Bergerard	T	Zoologie (Orsay)
Bertein	T	Electronique (Orsay)
Bouissieres ...	T	Radiochimie
Mme Couture .	T	Thermodynamique et Mécanique physique
Ellenberger ..	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.)
Schnell		Botanique trop.
Stolkowski ...	T	Physiologie végétale
Acher	T	Chimie biologique
Baudoin	T	Biologie animale (P.C.B.)
Beaumont		Biologie anim. (S.P.C.N.)
Blamont		Géophysique Ionosphère
Bourreau	T	Botanique
D. Curie		Physique (M.G.P.)
Durand-Delga .	T	Géologie
Freon	T	Chimie organ. (Orsay)
Heller	T	Physiologie végétale
Tortrat	T	Calcul des probabilités
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.)
Magnan		Physique électricité
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire
Mlle Fourcroy		Biologie végét. (S.P.C.N.)
Mme Choquet-Bruhat		Mécanique analytique et Mécanique céleste
Mlle Veil	T	Physiologie générale
Lwoff	T	Microbiologie
Siestrunck ...	T	Mécanique physique et expérimentale
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
Brochard	T	Physique (P.C.B., Orsay)
Cabannes	T	Mécanique générale
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay)
Mazet	T	Mécanique génér. (Orsay)
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique
Comolet		Mécanique des fluides
Corabœuf	T	Physiologie anim. (Orsay)
Delloue	T	Physique de l'exosphère
Gorenflot ...		Botanique II (Orsay)

Houillon		Biologie animale (P.C.B.)
J. Jullien		Chimie (S.P.C.N., Orsay)
Malgrange	T	Tech. math. de la Physique (Orsay)
Olivier		Anthropologie
Nozeran	T	Botanique II (Orsay)
Blanc-Lapierre	T	Physique E.N.S. (Orsay)
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay)
Kahane	T	Mathématiques (Orsay)
Samuel	T	Math. E.N.S. féminines
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay)
Thiry	T	Mécanique céleste
Abeles		Physique (S.P.C.N.)
Amat	T	Physique (P.C.B.)
Auboin	T	Géologie
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.)
Brunn	T	Géologie histor. (Orsay)
Chabbal	T	Physique (M.G.P., Orsay)
Deheuvels	T	Mathémat. propé.
D'Espagnat	T	Physique théor. (Orsay)
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.)
Mme Gans	T	Génétique
Geneves		Biologie végétale (P.C.B.)
Guilbert		Physiq. (C.U.S., Orléans)
Hupe	T	Pétrographie
Hollande	T	Biologie générale
Lions	T	Analyse numérique
Maitte	T	Chimie (P.C.B.)
Meyer		Physique propédeutique
Nicolas		Géologie appliquée
Panigel		Biologie générale
Ravier		Pétrographie
Roseau	T	Mécanique théorique des fluides
Roubine		Electronique
Silber	T	Chimie (P.C.B.)
Uebersfeld	T	Electronique
Yvon	T	Théories physiques
Hervé	T	Mathématiques
Néron	T	Mathé. (M.P.C., Orsay)
Mme Pecker Wimel	T	Astrophysique
Balkansky		Physique (M.P.C.)
Le Corre	T	Electricité
Delcroix	T	Physique théor. (Orsay)
Gourdin		Physique théor. des hautes énergies (Orsay)
Lehmann	T	Phys. expér. des hautes énergies
Nataf	T	Physique nucl. et Radio activité (Orsay)
Echalier		Biologie animale (P.C.B.)
Barraud		Physiologie cellulaire
Lioret		Physiologie végé. (Orsay)
Dars		Géologie structurale et géologie appliquée
Camefort	T	Botanique (agrégation)
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle
Blaquière		Electronique (Orsay)
Arnous	T	Physique théorique
Tatibouet		Chimie (C.S.U., Orléans)
Mallivin	T	Mathém. propé. (Orsay)
Gaudemar		Chimie propédeutique
Perez y Jorba		Physique expé. des hautes énergies (Orsay)
David	T	Chimie (agrégat. Orsay)
Brousse	T	Mécanique théorique
Rosch	T	Astronomie
Guy	T	Physique expérimentale
Lazard		Mathématiques (M.P.C.)
P. Morel		Physique (M.P.C.)
Arsac		Programmation
Lefebvre		Chimie (M.P.C.)
Chappeville		Biochimie
Benoit		Physique (C.P.E.M.)
Rio		Chimie (C.P.E.M.)
Jauzein		Géologie (E.N.S.)
G. Prévost		B.V. (C.P.E.M.)
P. Favard		B.A. (C.P.E.M.)
Vilkas		Chimie (C.P.E.M.)
Mlle Ficini		Chimie (C.P.E.M.)
Lequeux		Astronomie
Cohen Tannoudji		Physique (M.P.C.)
Tavernier		Physique (C.P.E.M.)
Mme Roizen		Physique (C.P.E.M.)
M. Durand		B.A. (S.P.C.N.)
Pascaud		Physiologie
Mme Petit		B.A. (C.P.E.N.)
Brousse		Géologie (Orsay)
Cagniac		Physique agrég. (Orsay)
Leberre		Zoologie (Orsay)
Scheffer		Microbiologie (Orsay)
De Gennes		Phys. des solides (Orsay)
Riou		Phys. nuclé. exp. (Orsay)
Clauser		Chimie biol. (Orsay)
Chevalier		Physiol. animale (Orsay)
Jancovici		Physique atom. (Orsay)
Falk-Vairant		Physique nucl. (Orsay)
Fetizon		Chimie propé. (Orsay)
Cerf		Mathématiques (Orsay)
Lurcat		Physique
Rigaudy		Chimie (S.P.C.N.)
Sigwalt		Chimie (S.P.C.N.)
Fournet		Electricité générale
Collongues		Chimie (C.P.E.N.)
Dubert		Biochimie
Lavorel		Biologie physico-chimique
Morel (F.)		Physiologie comparée
Talbot		Génétique chimique
Mme Nougarède		Botanique
François		Zoologie
Ivanoff		Océanographie physique
Cadiot		Chimie organique
Baruch		Physique propédeutique
Nozières		Physique générale
Bok		Physique propédeutique
Slonimski		Génétique

Secrétaire général . R. Poullain

Les principaux produits utilisés ont l'origine suivante :

— Biscuits Causse : Ets Causse, Paris.

— Régimes UAR-Elevage et UAR-Entretien : Alimentation Rationnelle Equilibrée, Villemoisson-sur-Orge (S.-et-O.).

— Caséine dévitaminée spéciale : Ets Clin-Byla, Paris.

— Mélange de vitamines complet ou exempt de vitamine B_6 (Vitamin Diet Fortification Mixture) ; L et DL-éthionine ; Puromycine : Nutritional Biochemical Corporation (NBC), Cleveland, U.S.A.

— L-méthionine ; L-cystéine ; DL-homosérine ; DL-allocystathionine ; 8-azaguanine : California Corporation for Biochemical Research (Calbiochem), U.S.A.

— L-alanine ; DL-tryptophane ; DL-thyroxine ; 5-fluorouracile ; Pyridoxine ; Phosphate de pyridoxal : Ets Hoffmann-La-Roche, Paris.

— Suspension d'acétate d'hydrocortisone à 25 mg/ml : Ets Roussel, Paris.

--- Phosphate de pyridoxal : Roche Products, Londres.

— Pyruvate de sodium : Ets Boehringer et Soehne, Mannheim, Allemagne (fourni par les Ets Biotrol, Paris).

— Produits chimiques courants : Prolabo, Paris.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0021

INTRODUCTION

Nous présentons dans ce mémoire un certain nombre d'observations concernant les modifications de l'activité, dans le foie du rat, d'un enzyme à phosphate de pyridoxal, la cystéine désulfurase « soluble » ou cystathionase, sous l'influence de divers facteurs nutritionnels et hormonaux.

Le nom de cystéine désulfurase « soluble » avait été provisoirement proposé [1] pour définir l'enzyme localisé dans la fraction soluble d'un homogénat de foie de rat et qui catalyse la production d'hydrogène sulfuré à partir de la L-cystéine. Récemment il a été établi, de manière indépendante dans deux laboratoires [2, 3, 4, 5, 6] que la désulfuration de la L-cystéine dans la fraction soluble du foie n'était pas due à un enzyme spécifique mais qu'elle était, en fait, catalysée par la cystathionase. Un tel résultat avait été précédemment suggéré par les recherches de Binkley et coll. [7, 8, 9] et celles de Matsuo et Greenberg [10], ces derniers auteurs ayant d'ailleurs cristallisé la cystathionase du foie de rat. L'enzyme que nous avons choisi pour cette étude présente donc une particularité : il s'agit d'un enzyme multifonctionnel, catalysant la désamination de plusieurs substrats (cystathionine, homosérine, cystéine, cystine), cette désamination s'accompagnant de la déshydratation des acides aminés hydroxylés ou de la désulfhydration des acides aminés thiols. Le substrat que nous avons le plus couramment utilisé dans nos recherches est la L-cystéine.

Lorsque nous avons entrepris ces recherches, en octobre 1960, la tryptophane pyrrolase et la transaminase tyrosine-acide-α-cétoglutarique, enzymes présents dans le foie et intervenant respectivement dans le métabolisme du tryptophane et de la tyrosine représentaient, sans nul doute, les deux principaux exemples qui pouvaient servir de modèles pour l'étude de la régulation des activités enzymatiques chez les animaux. En effet, d'après diverses observations dues essentiellement à Knox et coll. [11, 12], il avait été établi que

des injections de substrats ou d'hormones cortico-surrénaliennes à des rats provoquent des modifications spectaculaires de l'activité de ces deux enzymes dans le foie de ces animaux. Bien qu'il n'ait pas été possible, à cette époque, de proposer des interprétations satisfaisantes pour rendre compte de tels phénomènes, il ne s'agissait là cependant ni d'observations isolées ni d'enzymes manifestant un comportement exceptionnel : des études minutieuses avaient conduit à la mise en évidence de l'influence de diverses hormones (insuline, glucagon, hydrocortisone) et de la composition du régime alimentaire sur l'activité, dans le foie, d'enzymes du métabolisme des hydrates de carbone tels que la glucose-6-phosphatase et la phosphorylase du glycogène. La bibliographie détaillée relative aux travaux déjà effectués à cette époque peut être consultée dans deux revues, l'une, due à ASHMORE et WEBER [13] et consacrée à la glucose-6-phosphatase, l'autre dans laquelle TEPPERMAN et TEPPERMAN [14] examinant l'effet des hormones sur les cellules et les constituants cellulaires, discutent de manière approfondie le cas de la phosphorylase du glycogène.

La lecture de ces revues faisait clairement apparaître qu'il n'était pas encore possible de regrouper et coordonner les connaissances acquises, mais aussi mettait en lumière l'intérêt que présentaient des études systématiques de l'influence de ces divers facteurs sur les enzymes, tant pour essayer de préciser quelles étapes métaboliques sont affectées par les hormones que pour s'efforcer de dégager les mécanisme de régulation des activités enzymatiques chez les animaux. Et en effet, au cours des cinq dernières années, un nombre toujours croissant de publications consacrées à ces problèmes a paru, rapportant des résultats obtenus en mettant en œuvre les méthodes les plus variées. Notre travail s'intègre dans cet effort et représente une contribution à l'étude des régulations métaboliques chez les animaux.

Actuellement, les exemples d'altérations d'activités enzymatiques dans les tissus animaux sous l'effet de divers facteurs nutritionnels et hormonaux sont fort nombreux, et les principaux résultats obtenus ont fait l'objet d'exposés détaillés regroupés dans deux volumes d'une revue récente [15]. Si, dans la plupart des cas, les mécanismes biochimiques qui règlent ces modifications d'activité enzymatique restent encore largement inconnus, un certain nombre d'hypothèses, compte tenu des résultats acquis, ont pu être formulées qui orientent d'ultérieures recherches. En effet, quelques points précis ont déjà pu être mis en évidence qui permettent de mieux définir le rôle joué par divers facteurs (substrats, coenzymes, hormones) dans les modifica-

tions d'activité de certains enzymes. Nous aurons l'occasion de faire état de la plupart de ces points lors de l'exposé de nos propres recherches.

A ce propos, il semble de quelque intérêt de rappeler qu'une modification de l'activité d'un enzyme dans un tissu extrait d'un animal soumis à un traitement déterminé peut refléter soit la présence dans ce tissu d'activateurs ou d'inhibiteurs n'existant pas ou existant en quantité différente dans le même tissu provenant d'un animal non traité, soit des altérations de la quantité d'apoenzyme elle-même. Les conséquences de ces deux propositions sont les suivantes : tout d'abord, il est indispensable de mesurer l'activité enzymatique dans des conditions strictement contrôlées où une telle mesure rend effectivement compte de la concentration en apoenzyme, c'est-à-dire essentiellement en présence de concentrations saturantes en substrats et en cofacteurs ; de telles conditions de concentration en substrats et en cofacteurs ne sont d'ailleurs généralement pas réalisées dans le milieu dans lequel l'enzyme fonctionne « *in vivo* » et c'est pourquoi la détermination parallèle du taux des cofacteurs et du taux des substrats dans ce milieu présente un intérêt non négligeable. Enfin il semble raisonnable d'effectuer les mesures d'activités enzymatiques sur une préparation non purifiée, ceci afin d'éviter autant que peut se faire, l'élimination d'éventuels activateurs ou inhibiteurs. De plus, il est de quelque utilité de contrôler la présence de ces éventuels activateurs ou inhibiteurs en effectuant des expériences « croisées », c'est-à-dire dans lesquelles l'activité enzymatique est déterminée sur un mélange de préparations provenant de tissu d'un animal normal et de tissu d'un animal soumis à un traitement donné. Il est évident que cette manière de faire ne permet pas de préciser quels sont ces activateurs ou inhibiteurs de l'enzyme et que d'autres expériences réalisées alors sur la préparation enzymatique brute et mieux encore sur une préparation d'enzyme aussi purifiée que possible, sont nécessaires à cette recherche.

Nous n'avons pas jusqu'ici envisagé la possibilité que l'un des traitements adoptés puisse provoquer la synthèse d'un enzyme dont la structure primaire soit différente de celle de l'enzyme normal, et que cette modification de structure s'accompagne de variations des propriétés catalytiques. Toutefois, un tel aspect du problème mérite lui aussi d'être abordé dans certains cas, et nous nous efforcerons de le faire lorsqu'une telle possibilité semblera plausible.

Ce mémoire comporte trois parties : dans la première, nous exposons les méthodes mises en œuvre, en particulier nous définissons les traitements imposés aux animaux, et nous justifions nos conditions de mesure des activités enzymatiques ; dans la seconde, nous

rapportons les résultats obtenus lors de l'étude de l'influence de quelques facteurs (régimes alimentaires, pyridoxine, hormones corticosurrénaliennes et thyroïdiennes, substrats, éthionine) sur l'activité de la cystathionase. Enfin, dans la troisième partie, nous regroupons les divers résultats obtenus, essayons de les relier entre eux et de préciser le mécanisme d'action des divers facteurs étudiés.

TECHNIQUES

CHAPITRE I

TRAITEMENT DES ANIMAUX

Les expériences sont faites sur des rats mâles ou femelles de souche Wistar provenant généralement du Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette : il s'agit, dans la plupart des cas, de Wistar WAG, toutefois lors de certains essais, des animaux de souche Wistar WCF ont été employés, ce point sera précisé dans les tableaux de résultats. Enfin occasionnellement des rats fournis par l'élevage de la Société de Chimie Organique et Biologique (anciennement Alimentation Equilibrée), à Commentry, ont été utilisés.

A leur arrivée au laboratoire, les animaux reçoivent l'un des régimes décrits ci-dessous.

1) Régimes alimentaires auxquels sont soumis les animaux

a) Régimes du commerce :

— Biscuits Causse : de composition mal déterminée.

— Aliment complet pour rats élevage (UAR-Elevage) normalement destiné à des rats pesant de 60 g à 150 g et contenant en particulier 20 % de protéines d'origines diverses (viandes, poissons...).

— Aliment complet pour rats entretien (UAR-Entretien) destiné à des rats pesant plus de 150 g et qui contient 17 % de protéines.

b) Régimes synthétiques :

Il s'agit de régimes dont la seule source de protéine est la caséine ; ces régimes contiennent tous 5 % d'huile de germes de maïs, de la caséine dont la teneur varie de 5 % (régime A) à 18 % (régime B) ou 60 % (régime C), du saccharose (84 % dans le régime A, 71 % dans le régime B, 29 % dans le régime C) et 4 % d'un mélange de

sels minéraux qui comporte pour 100 g de régime : 0,28 g de chlorure de sodium, 1,60 g de citrate de potassium (H_2O), 1,67 g de phosphate bicalcique (2 H_2O), 0,38 g de sulfate de magnésium (7 H_2O), 64 mg de citrate ferrique (6 H_2O), 4 mg d'iodure de potassium, 3 mg de fluorure de sodium, 0,8 mg de sulfate de manganèse (H_2O), 0,35 mg d'iodure cuivreux, 1,3 mg d'alun de potassium (24 H_2O) et 0,35 mg de chlorure de zinc [16]. Ces régimes contiennent de plus 2 % d'un mélange de vitamines (NBC) qui comporte pour 100 g de régime : 9 mg de vitamine A (à 200 000 unités par gramme), 0,50 mg de vitamine D (400 000 unités par gramme), 90 mg d'acide ascorbique, 150 mg de chlorure de choline, 10 g d'inositol, 10 g de α-tocophérol, 2,70 mg de vitamine B12, 4,50 mg de ménadione, 10 mg d'acide paraaminobenzoïque, 9 mg d'acide nicotinique, 2 mg de pyridoxine, 2 mg de thiamine, 6 mg de pantothénate de calcium, 40 μg de biotine, 180 μg de riboflavine et 2 μg d'acide folique.

c) Régimes synthétiques enrichis en un constituant ou additionné d'une substance déterminée :

— *Régime enrichi en méthionine :*

Selon Freedland et Harper [17], 9 g de caséine contiennent 0,3 g de méthionine ; un régime à 18 % de caséine en contient donc 0,6 % et un régime à 60 % de caséine 2 %. Dans certaines expériences, nous avons introduit dans le régime B (18 % de caséine) une quantité de DL-méthionine telle que la teneur totale en cet acide aminé soit sensiblement égale à celle du régime C, c'est-à-dire 1,4 g de DL-méthionine pour 100 g de régime.

— *Régime enrichi en cystine :*

D'après Cerecedo et coll. [18], un régime à 18 % de caséine est légèrement déficitaire en acides aminés soufrés ; aussi avons-nous utilisé pour certaines déterminations le régime B enrichi en L-cystine à raison de 0,5 g/100 g de régime.

— *Régime additionné d'éthionine :*

L'éthionine est un antagoniste de la méthionine, et, d'après Freedland et Harper [17], le rapport éthionine/méthionine dans un régime doit être environ 2,7 pour que l'action de l'éthionine se manifeste. Les animaux recevront donc au cours de certaines expériences l'un des régimes synthétiques additionnés de DL-éthionine : 0,5 à 1,5 % de DL-éthionine dans le régime A, 1,5 à 2,5 % dans le régime B ; la quantité d'éthionine introduite dans le régime C a, toutefois, été limitée à 2 ou à 2,5 %.

d) Régime carencé en vitamine B_6 :

Il s'agit d'un régime à 18 % de caséine contenant 2 % d'un mélange de vitamines également fourni par les laboratoires NBC, analogue à celui décrit précédemment, la seule différence étant l'absence de vitamine B_6.

Avant d'être soumis à un régime synthétique carencé en vitamine B_6 ou enrichi en un constituant, les animaux reçoivent pendant 8 jours au moins le régime synthétique complet, ceci pour les accoutumer à la nourriture. Dans tous les cas, les animaux reçoivent les régimes à volonté.

2) Ablations de certaines glandes endocrines

Toutes les opérations sont effectuées sous anesthésie à l'éther.

a) Surrénalectomie :

Les animaux opérés reçoivent comme boisson une solution de ClNa à 1 % ; ils sont utilisés 7 à 8 jours après l'ablation des surrénales.

b) Thyroïdectomie :

Comme il y a parallèlement ablation des parathyroïdes, les animaux disposent comme boisson d'une solution de lactate de Ca à 1 %. Ils sont généralement utilisés 10 jours à 3 semaines après l'opération.

c) Ovariectomie :

Les animaux sont sacrifiés 3 semaines après l'ablation des ovaires.

3) Injections de diverses substances

Ces injections sont très généralement faites par voie intra-péritonéale ; cependant les injections de thyroxine sont faites, dans certains cas, par voie sous-cutanée.

a) Acides aminés :

Les acides aminés (L-cystéine, L-méthionine, DL-homosérine, L-alanine, DL-tryptophane) sont injectés aux rats à raison générale-

ment de 3,3 mmoles par kg d'animal pour les acides aminés L, de 6,6 mmoles pour les acides aminés DL : ces concentrations avaient été employées pour l'étude de l' « induction » de la transaminase tyrosine-acide-α-cétoglutarique par la tyrosine [19].

b) Hydrocortisone :

On utilise une suspension d'acétate d'hydrocortisone ; les injections sont faites pendant 3 jours à raison de 12 mg par jour et par 100 g de rat [20].

c) Thyroxine :

Chaque rat reçoit 500 μg de DL-thyroxine par jour, soit 0,5 ml d'une solution préparée de la façon suivante : 20 mg de DL-thyroxine sont dissous dans 8 ml d'une solution très diluée de soude, puis on ajoute du chlorure de sodium 1,5 % en quantité telle que le volume final soit de 20 ml [21].

d) 8-azaguanine :

La solution de 8-azaguanine est préparée selon les indications de Kvam et Parks [22] : la 8-azaguanine est dissoute dans la soude 5 N, puis le pH de la solution est remené au voisinage de la neutralité par de l'acide chlorhydrique 5 N ; on ajoute ensuite du ClNa en quantité telle que la concentration finale soit de 0,9 %, au besoin on ajuste le volume avec de l'eau. La solution ainsi préparée est injectée en quantité telle que chaque rat reçoit 40 mg d'azaguanine pour 100 g de poids, soit en trois fois, deux injections étant faites la veille du jour où les animaux sont sacrifiés, la troisième quatre heures avant le sacrifice, soit en six fois à raison de deux injections par jour pendant trois jours.

e) 5-fluorouracile :

Les injections sont faites dans les mêmes conditions que celles décrites par Gaetani et Spadoni [23], c'est-à-dire que les rats reçoivent une ou deux injections (à vingt-quatre heures d'intervalle) de 25 mg de 5-fluorouracile par 100 g de poids.

f) Ethionine :

Dans une série d'expériences, nous avons utilisé de la DL-éthionine et, suivant les indications de Weber et coll. [24], injecté aux animaux, en vingt-quatre heures, trois fois 75 à 100 mg de DL-éthionine

pour 100 g de rat. Au cours d'expériences plus récentes, nous avons injecté aux rats de la L-éthionine à raison de 3,3 mmoles par kg d'animal, soit environ 54 mg/100 g.

g) Puromycine :

Les animaux reçoivent 4 fois 5 mg de puromycine par 100 g de poids ; dans certaines expériences, les injections sont faites toutes les heures (pendant 4 heures donc) et les animaux sont tués 1 heure après la dernière injection : ce sont les conditions utilisées par Gorski et coll. [25] qui constatent alors une inhibition de 15 % de la synthèse protéique dans le foie. Dans d'autres expériences, les animaux sont injectés, tous les jours, pendant 4 jours, et sacrifiés 4 h après la dernière injection [26].

D'une manière générale, les animaux sont sacrifiés 4 heures après la dernière injection.

h) Pyridoxine :

Les doses de pyridoxine (Becilan) injectées et le temps qui s'écoule entre l'injection et le sacrifice des animaux varient d'une expérience à l'autre, aussi les conditions du traitement seront-elles précisées dans les tableaux de résultats.

CHAPITRE II

MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

1) Préparation des extraits enzymatiques

Les rats sont sacrifiés par décapitation, et les foies immédiatement prélevés ; dans certains cas, les foies sont, avant prélèvement, perfusés avec une solution refroidie de ClNa à 0,9 %. Les foies sont ensuite pesés, puis broyés au moyen d'un appareil du type Potter-Elvejhem dans une solution refroidie de saccharose à 8,5 % (2 volumes de cette solution pour 1 gramme de foie). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé de façon à séparer la fraction soluble des fractions particulaires ; pour cela, on utilise soit une Ultracentrifugeuse Spinco (centrifugation à 105 000 g pendant 45 minutes), soit une Ultracentrifugeuse Internationale HR 1 (centrifugation à 40 000 g pendant 2 heures). On obtient un culot qui est éliminé et un liquide surnageant qui est la fraction soluble contenant la cystéine désulfurase « soluble » ou cystathionase [1] et la sérine déhydrase [27]. Le volume du surnageant est ramené au volume de l'homogénat de départ par la solution de saccharose à 8,5 %.

2) Mesure de désulfuration

La désulfuration de la cystéine est mesurée dans des cellules de Warburg à deux ampoules latérales, selon une méthode mise au point au laboratoire [21] et voisine de celle décrite par THOMPSON et GUERRANT [28] et JOHNSON et coll. [29]. Les réactifs sont répartis comme suit :

— dans le compartiment principal, du tampon phosphates M/5 à pH 7,3, la préparation enzymatique (0,5 à 1 ml de surnageant, ce qui correspond à environ 170 mg à 340 mg de foie frais), et éventuellement 100 μg d'une solution de phosphate de pyridoxal (PLP) fraîchement préparée ;

— dans le puits central : un morceau de papier Whatman n° 1 imprégné d'une solution d'acétate de zinc à 22 % ;
— dans l'une des ampoules latérales : le substrat, c'est-à-dire une solution de chlorhydrate de L-cystéine neutralisé telle que la concentration finale dans le milieu réactionnel, soit 10^{-1} M ;
— dans l'autre ampoule latérale : de l'acide sulfurique 12 N.

Les réactions sont faites à 37°, en atmosphère d'azote, afin d'éviter au maximum l'oxydation de la cystéine en cystine ; 30 minutes après l'introduction de la cystéine dans le compartiment central, les réactions enzymatiques sont arrêtées par acidification. L'hydrogène sulfuré formé se dégage et vient se fixer sur le papier imprégné d'acétate de zinc. Les cellules sont laissées encore quelques minutes sous agitation en atmosphère d'azote. Le papier est ensuite recueilli dans un erlenmeyer contenant environ 10 ml d'eau distillée, 1 ml d'HCl 6 N et très exactement 0,2 ml d'iode 0,1 N. Il se forme la réaction suivante :

$$H_2S + I_2 \longrightarrow S + 2\ IH$$

L'iode en excès est dosé par une solution d'hyposulfite de sodium N/100.

$$2\ S_2O_3Na_2 + I_2 \longrightarrow S_4O_6Na_2 + 2\ INa$$

Afin de justifier les conditions du dosage adoptées ci-dessus, nous avons fait une étude cinétique sur la préparation enzymatique telle que nous l'utilisons. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux déjà obtenus au laboratoire [3] sur une préparation enzymatique partiellement purifiée.

a) Influence de la concentration en substrat (*fig. 1*) :

Il ressort de l'étude de la *figure 1* que la vitesse maximum de désulfuration n'est pas atteinte pour une concentration en cystéine égale à 10^{-1} M ; toutefois, cette concentration de 10^{-1} M sera adoptée au cours de nos expériences ; en effet, à partir de cette concentration, la solubilité de la cystéine devient facteur limitant.

b) Influence de la concentration en enzyme (*fig. 2*) :

L'examen des courbes de la *figure 2* montre que la vitesse de désulfuration de la cystéine est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme introduite dans le milieu de réaction.

c) Influence du pH (*fig. 3*) :

D'après la figure, nous voyons que la cystéine désulfurase est plus active aux pH légèrement alcalins.

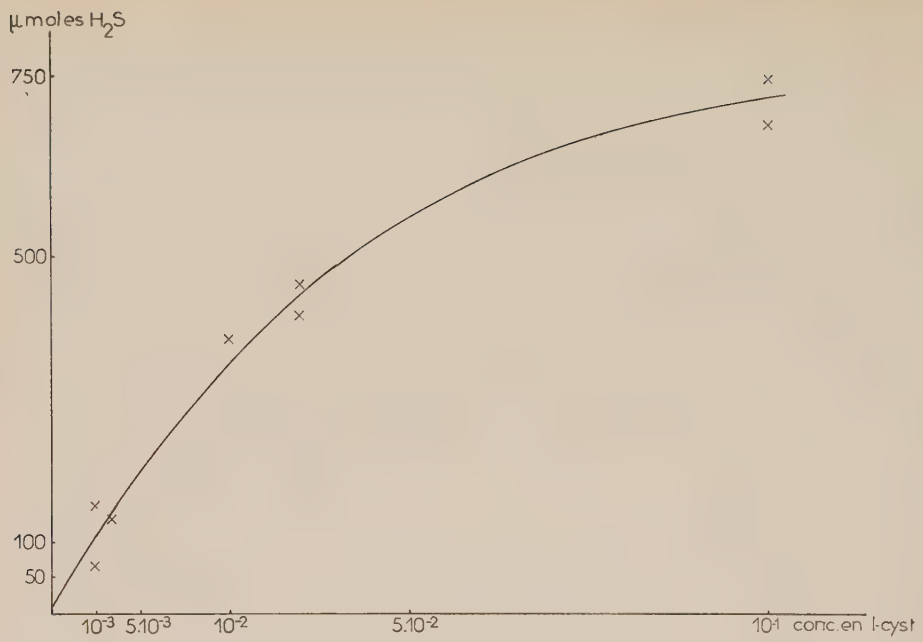

Fig. 1 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

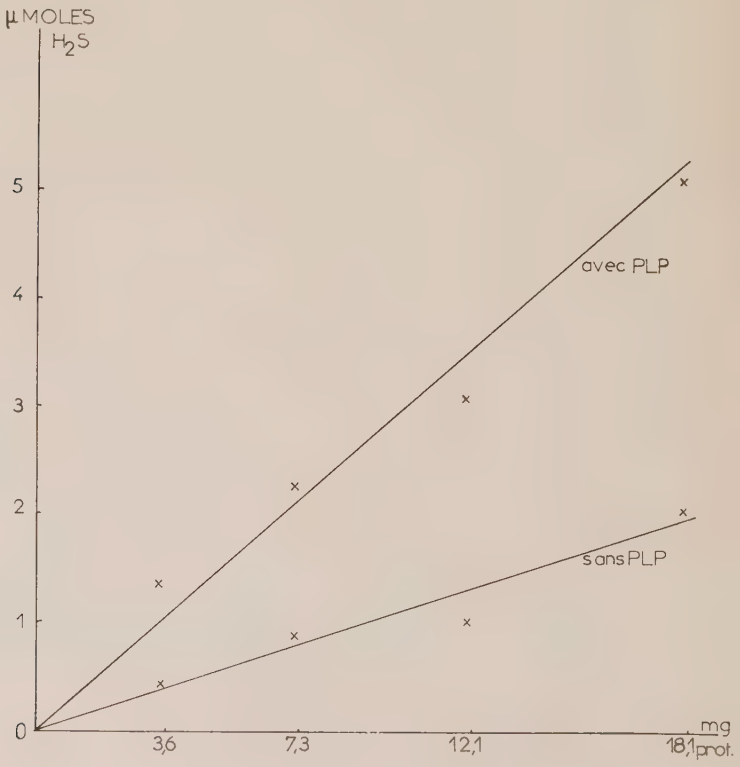

Fig. 2 : Influence de la concentration en enzyme sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

d) Influence de la concentration en PLP :

Nous avons constaté que la vitesse de désulfuration est maximum pour une concentration en PLP de 5,3 . 10^{-5} M ; mais les solutions de PLP se détériorent rapidement sous l'action de la lumière et avec le temps, aussi d'une manière générale, chaque cellule contiendra du PLP à la concentration de 2,7 . 10^{-2} M.

e) Influence du temps de réaction (*fig. 4*) :

La vitesse de dégagement de l'H_2S est proportionnelle au temps de réaction pendant plus de 60 minutes. Avec un temps de réaction de 30 minutes, nous sommes certains d'être dans la partie linéaire de la courbe ; la pente de la droite représente bien l'activité de l'enzyme.

3) Mesure de désamination

L'homosérine et la sérine donnent naissance, par désamination enzymatique, à de l'ammoniac et à un acide cétonique (l'acide α-cétobutyrique dans le cas de la désamination de l'homosérine, l'acide pyruvique dans le cas de la sérine); on peut donc mesurer la désamination de ces acides aminés en dosant soit l'un, soit l'autre des produits formés.

En ce qui concerne la dégradation de la cystéine, on sait qu'elle provoque la formation d'H_2S, d'ammoniac et soit d'acide pyruvique aux faibles concentrations en cystéine, soit d'alanine aux fortes concentrations [3].

a) Désamination de la sérine :

Nous avons adopté une méthode voisine de celle utilisée par Selim et Greenberg [27]. La préparation enzymatique correspondant à environ 35 mg de foie frais est placée dans des tubes contenant du tampon borate pH 8,3 M/20 et 100 μg de phosphate de pyridoxal. Les réactions sont faites à 37° dans un appareil de Dubnoff sous atmosphère d'azote. Au temps 0, on ajoute une solution de L-sérine telle que la concentration finale dans le milieu soit de 5 . 10^{-3} M ; après 15 à 20 minutes, une solution d'acide trichloracétique à 50 % est ajoutée dans les tubes pour arrêter la réaction. Les protéines précipitées par l'acide sont éliminées par une centrifugation de 10 minutes à 1 500 g et, sur le surnageant ainsi obtenu, on dose le pyruvate et l'ammoniac.

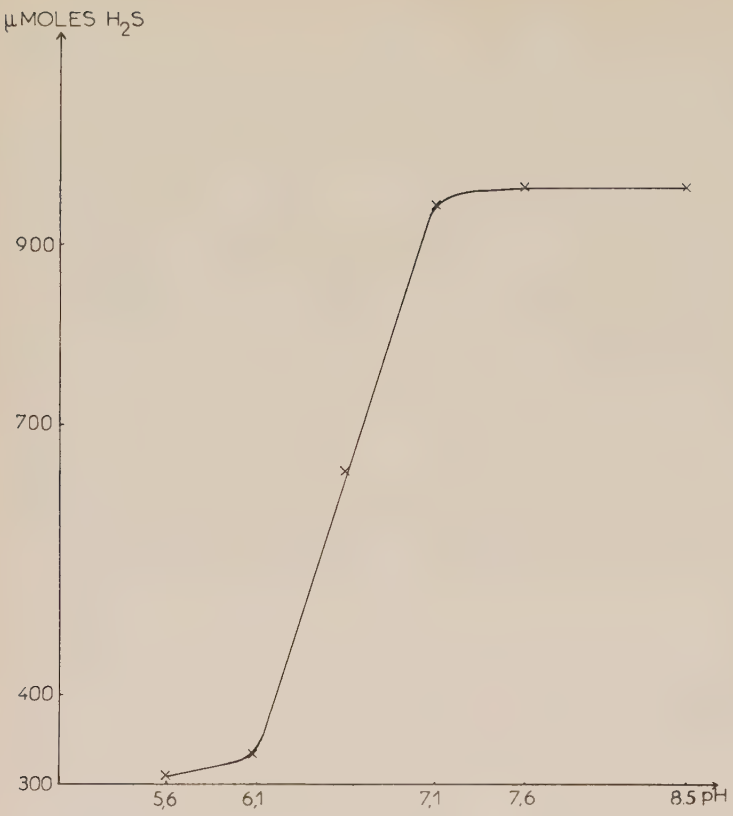

Fig. 3 : Influence du pH sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

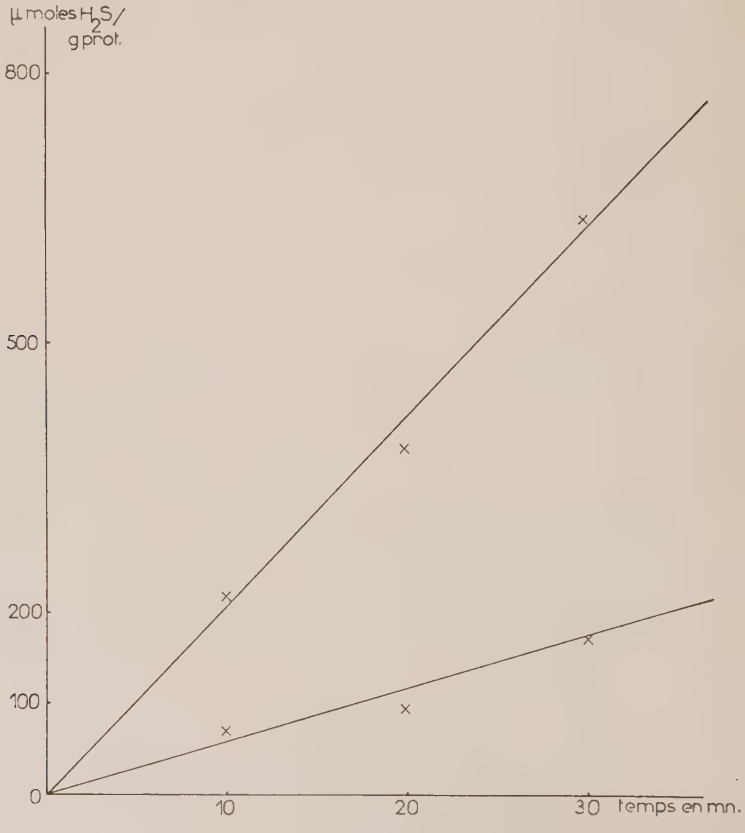

Fig. 4 : Influence du temps de réaction sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

b) Désamination de l'homosérine :

La désamination de l'homosérine est mesurée selon une méthode voisine de celle décrite par Matsuo et Greenberg [10] : la préparation enzymatique correspondant à 35 mg de foie frais environ est placée dans un tampon phosphate pH 7,3 M/5 en présence de 100 μg de PLP, l'homosérine est utilisée à une concentration finale de $5 . 10^{-3}$ M. La suite des manipulations est alors identique à celles décrites pour la sérine.

— *Dosage de l'ammoniac :*

C'est un dosage colorimétrique qui nécessite la diffusion préalable de l'ammoniac du surnageant, et qui est effectué selon la méthode de Russel [30]. Pour la diffusion, on utilise des cellules de Conway : dans le compartiment intérieur, on place de l'acide chlorhydrique N/200 et, dans le compartiment extérieur, la prise d'essai contenant 2 à 8 μg d'azote, puis une solution saturée de CO_3K_2. Au contact du carbonate, l'ammoniac se dégage et vient se fixer sur l'acide chlorhydrique. Après une diffusion d'une heure, le contenu du compartiment central est prélevé et placé dans un tube plongé dans de la glace. On ajoute une goutte de Cl_2Mn 0,003 M, 1 ml de réactif phénate alcalin et 0,5 ml d'hypochlorite de Ca ; ces deux dernières solutions sont préparées selon les indications de Russel.

Les tubes sont agités, mis 5 minutes dans un bain-marie bouillant ; il se forme une coloration bleue, probablement due à la formation d'un indophénol, lue au spectrophotomètre à 625 mμ. Les résultats sont reportés sur une courbe étalon établie, lors de chaque dosage, à l'aide d'une gamme faite avec une solution connue de sulfate d'ammonium.

— *Dosage des acides cétoniques :*

La quantité de pyruvate contenue dans le surnageant est déterminée par la méthode de Friedemann et Haugen [31]. C'est un dosage colorimétrique fondé sur la propriété du groupement cétonique de réagir avec la 2-4 dinitrophénylhydrazine en milieu acide pour donner la dinitrophénylhydrazone correspondante. Une partie aliquote du surnageant et 0,5 ml d'une solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,1 % dans de l'acide chlorhydrique N sont mis dans des tubes que l'on place à 25° pendant 5 minutes si l'on dose l'acide pyruvique, pendant 20 minutes à 30° si l'on dose l'acide α-cétobutyrique ; on ajoute ensuite 5 ml d'acétate d'éthyle (ou de toluène) pour extraire l'hydrazone de l'acide cétonique ; les tubes sont fortement agités pen-

dant 10 minutes. Il se forme alors deux phases : la phase aqueuse inférieure est éliminée ; à la phase supérieure, on ajoute 3 ml d'une solution de carbonate de sodium à 10 % pour extraire l'hydrazone. Deux nouvelles phases se forment ; la phase supérieure est prélevée et additionnée de soude 5 N, une coloration brun rouge dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'hydrazone présente se développe. Les lectures sont faites à 530 mμ et les résultats reportés sur une courbe étalon établie avec une solution standard d'acide pyruvique ou d'acide α-cétobutyrique.

4) Dosage des protéines

Le dosage est effectué d'après la méthode de Lowry et coll. [32] : les acides aminés aromatiques des protéines réagissent avec le réactif de Folin et Ciocalteu, en milieu alcalin et en présence de cuivre, en donnant une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'essai. Le dosage est effectué sur le surnageant obtenu après centrifugation à l'Ultracentrifugeuse Spinco : 5 ml d'une solution cuproalcaline préparée selon Lowry et coll. sont ajoutés à une prise d'essai contenant de 40 à 200 μg de protéines ; après 15 minutes, on introduit 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu en agitant fortement les tubes. La coloration se développe en 45 minutes. Les lectures sont faites au spectrophotomètre à 660 mμ. Pour établir un rapport entre la lecture au spectrophotomètre et la quantité de protéine, nous avons, dans plusieurs cas, évalué celle-ci, soit en déterminant le poids sec de préparations dialysées, soit en dosant l'azote selon la méthode de Kjeldahl.

5) Dénaturation thermique

Il s'agit d'une dénaturation thermique ménagée en fonction du temps. Les préparations enzymatiques sont placées 5 minutes à 65° ; il se forme un précipité abondant qui est éliminé par une centrifugation de 5 minutes à 1 500 g. Le surnageant obtenu est à nouveau placé à 65° ; des parties aliquotes sont prélevées au temps 0, puis toutes les 10 ou 15 minutes. On mesure, dans les conditions habituelles, la production d'hydrogène sulfuré des prélèvements, et on établit une courbe en portant en abscisse le temps de traitement et en ordonnée le logarithme de l'activité enzymatique résiduelle.

* *

REMARQUES SUR L'INTERPRETATION DES RESULTATS

Signalons tout d'abord que, pour la plupart des expériences, les rats utilisés sont des Wistar « WAG » ; mais depuis octobre 1964, le Centre de Sélection de Gif ne fournit plus que des rats Wistar « WCF » ; les animaux de cette dernière souche donnent, à âge égal, des sujets de poids beaucoup plus élevés ; nous avons déterminé le niveau enzymatique de la cystathionase dans le foie de ces rats, et constaté que, toutes choses égales par ailleurs, le taux d'enzyme n'est pas sensiblement modifié par rapport à celui mesuré dans le foie de rats de souche Wistar « WAG ». Toutefois, lorsque les expériences seront effectuées sur cette nouvelle souche, nous le signalerons dans le tableau des résultats.

De toutes façons, dans chacune de nos expériences, le taux d'enzyme des animaux traités est toujours comparé au taux d'enzyme présent chez des animaux témoins provenant du même lot. Cette manière d'agir permet donc d'être à l'abri d'éventuelles fluctuations du taux de l'enzyme provoquées par des influences (variations saisonnières ?) n'ayant aucun rapport avec le traitement imposé aux animaux.

D'autre part, les activités enzymatiques, qui représentent la moyenne de déterminations faites sur 3 animaux au moins, sur 6 à 10 en général, sont toujours exprimées, pour la désulfuration de la cystéine, en μmoles d'H_2S formé par heure par gramme de foie frais, pour la désamination de l'homosérine et de la sérine en μmoles de NH_3 ou d'acide cétonique formé par heure par gramme de foie frais ; dans certaines expériences, nous donnons aussi les résultats exprimés en μmoles d'H_2S ou de NH_3 formé par heure et par gramme de protéines.

Le dosage des protéines a souvent été effectué ; généralement, la quantité de protéines contenues dans 1 ml de préparation enzymatique (donc dans 1/3 de gramme de foie) varie peu quel que soit le traitement imposé aux animaux, le poids du foie n'est pas non plus modifié. Aussi les activités rapportées au gramme de foie expriment, à un facteur déterminé près, les activités par gramme de protéines. Toutefois, quand nous soumettons les animaux à des régimes dont la teneur en protéine varie, alors que le poids des foies reste le même, nous observons une différence entre la quantité de protéines contenues dans le foie de rats nourris avec un régime pauvre en

protéines et celle déterminée dans le foie de rats ayant reçu un régime riche en protéines ; dans ces cas précis, les résultats sont aussi exprimés en quantité de H_2S formé par gramme de protéines. Enfin, lorsque le traitement (éthionine par exemple) provoque outre une modification de l'activité de l'enzyme, une variation importante du poids du foie, sans que la teneur en protéines par gramme de foie soit affectée, nous calculons aussi l'activité du foie entier.

RESULTATS

CHAPITRE I

INFLUENCE DES REGIMES ALIMENTAIRES DES ANIMAUX

1) Régimes du commerce

Dans une première série d'expériences, nous avons mesuré l'activité de la désulfurase soluble du foie de rats de poids divers, nourris pendant 10 jours au moins avec certains régimes commerciaux.

D'après les résultats groupés dans le *Tableau I*, on constate que, quel que soit le poids des animaux, l'administration du régime « Causse » provoque l'établissement d'un taux d'enzyme très faible alors que l'emploi des régimes « UAR-Elevage » ou « UAR-Entretien » donne des niveaux de désulfuration beaucoup plus élevés ; on peut remarquer que si chez les rats pesant moins de 100 g, le régime « UAR-Entretien » ne paraît pas particulièrement favorable à l'enzyme, et si le régime « UAR-Elevage » donné à des rats pesant plus de 200 g n'est pas lui non plus particulièrement favorable à l'enzyme, les différences observées restent cependant peu importantes. Soulignons que, dans toutes ces expériences, nous avons déterminé l'activité de l'enzyme et en absence et en présence de phosphate de pyridoxal (PLP) ajouté *in vitro* et constaté que, dans tous les cas, l'activité de l'enzyme est nettement augmentée par addition de PLP. Ce phénomène peut refléter soit une non-saturation en coenzyme de l'enzyme du foie, soit une dissociation partielle du coenzyme lors de la préparation de l'extrait enzymatique. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point, mais précisons que, dans toutes nos expériences, l'activité enzymatique en présence de PLP sera toujours déterminée ; en effet, cette mesure rend compte de la quantité d'apoenzyme dans une préparation de foie, et c'est essentiellement ce problème qui nous intéresse. Si l'on détermine le pourcentage de saturation de l'apoenzyme en coenzyme, c'est-à-dire le rapport entre l'activité de l'en-

zyme mesurée sans addition de PLP *in vitro* et l'activité de l'enzyme mesurée en présence de PLP ajouté *in vitro*, soit :

$$\frac{(\text{activité} - \text{PLP})}{(\text{activité} + \text{PLP})} \times 100$$

nous constatons qu'il est, en général, compris entre 35 et 50, pour les animaux non traités ; le pourcentage de stimulation est le rapport suivant :

$$\frac{(\text{activité} + \text{PLP}) - (\text{activité} - \text{PLP})}{(\text{activité} - \text{PLP})} \times 100$$

Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié les modifications observées sur le niveau de la désulfurase soluble, lorsque les animaux passent d'un régime à un autre, le *Tableau II* rend compte de ces résultats. Des nombres de ce tableau, il ressort que le régime utilisé par l'élevage de Gif auquel sont soumis les animaux jusqu'à leur arrivée au laboratoire, donne un niveau de désulfuration important, surtout lorsque les déterminations sont faites en présence de PLP ajouté *in vitro*.

Le passage au régime « Causse » entraîne au bout de 6 jours une diminution du taux de la désulfurase, diminution encore plus importante après 12 jours de ce régime. Par contre, si on remplace le régime « Causse » par le régime « UAR-Entretien », il se produit une augmentation très nette du niveau de l'enzyme, que les mesures soient faites en présence ou en absence de phosphate de pyridoxal ; le niveau maximum de désulfuration est atteint après 8 jours de ce régime, il se maintient sensiblement constant ensuite. L'expérience inverse a été également faite : des rats ayant reçu, pendant 12 jours, le régime « UAR-Entretien » sont ensuite placés au régime « Causse » pendant un temps déterminé ; on observe alors une diminution importante du niveau de la désulfurase soluble (*Tableau II*).

Ces résultats nous permettent de conclure que les régimes du commerce sont de valeurs très inégales pour le problème qui nous intéresse, et que le niveau de la désulfurase peut être modifié sous l'influence de facteurs nutritionnels : cet enzyme manifeste une « adaptation métabolique » relativement rapide. Il est donc nécessaire, avant d'étudier l'effet produit par un traitement sur le niveau de l'enzyme, de soumettre les animaux à un régime donnant un taux constant d'activité ; nous avons généralement adopté le régime « UAR-Elevage », les animaux utilisés ayant le plus souvent moins de 150 g. Dans le cas où un autre régime est utilisé, nous le signalerons dans le tableau des résultats.

TABLEAU I : Activité de la désulfurase soluble dans le foie de rat mâle en fonction du poids des animaux et du régime commercial administré

Régime	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ml extrait enzymatique	µ moles H_2S/heure/g protéines		µ moles H_2S/heure/g foie frais		% saturation en coenzyme d	% stimulation par le coenzyme e
				- PLP [a]	+ PLP	- PLP	+ PLP		
Causse	115 (6)[b]	5,2	14,0	58±9 [c]	163±15	2,44±0,38	6,85±0,63	35,5	181
	183 (3)	8,4	14,0	77±8	172±14	3,23±0,33	7,2 ±0,6	44,7	123
UAR-Elevage	78 (3)	4,2	10,4	492±17	1420±49	15,6 ±0,5	43,3 ±1,5	36	177,5
	115 (8)	5,8	14,2	412±55	1100±88	17,5 ±2,3	46,8 ±3,7	37,5	167,5
	267 (5)	9,5	13,2	435±30	790±80	17,6 ±1,2	31,4 ±3,2	48,8	104
UAR-Entretien	91 (3)	4,1	14,0	417±37	692±141	17,5 ±1,6	29,0 ±5,9	60	65,5
	128 (6)	6,3	10,2	460±37	1223±127	14,2 ±1,2	37,4 ±3,9	37,4	121
	188 (6)	7,4	12,0	528±56	1082±86	19,0 ±2,0	39,0 ±3,1	48,5	105

a : — PLP : mesures faites sans addition de PLP *in vitro*.
+ PLP : mesures faites en présence de PLP ajouté *in vitro*.

b : nombre d'animaux utilisés au cours de l'expérience.

c : déviation standard de la moyenne.

d : % saturation en coenzyme $= \dfrac{\text{activité} - \text{PLP}}{\text{activité} + \text{PLP}} \times 100.$

e : % stimulation par le coenzyme $=$

$$\frac{(\text{activité} + \text{PLP}) - (\text{activité} - \text{PLP})}{\text{activité} - \text{PLP}} \times 100$$

TABLEAU II : Modification de l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle quand on passe d'un régime à un autre

Même légende que *Tableau I*

Régime et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ml extrait enzymatique	µmoles H_2S/heure/g protéines		µmoles H_2S/heure/g foie frais	
				- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP
Gif (3)	101	5,6	11,2	109 ± 28	875 ± 81	3,7 ± 0,9	29,4 ± 2,7
Causse : 12 j.(3)	118	5,5	11,2	94 ± 10	228 ± 39	3,2 ± 0,3	7,7 ± 1,3
UAR-Entretien : 8 j.(3)	147	5,7	12,8	437 ± 3	940 ± 30	16,8 ± 0,1	36,1 ± 1,2
15 j.(3)	162	7,2	13,2	432 ± 20	830 ± 23	17,2 ± 0,8	32,9 ± 0,9
UAR-Entretien : 12 j.(8)	89	5,5	12,8	470 ± 10	953 ± 13	18,0 ± 0,4	36,6 ± 0,6
Causse : 7 j.(6)	110	6,8	12,4	87 ± 16	182 ± 24	3,3 ± 0,6	6,8 ± 0,9
9 j.(6)	115	5,2	14,0	58 ± 9	163 ± 15	2,4 ± 0,4	6,9 ± 0,6

2) Régimes synthétiques

En vue de préciser quels peuvent être les facteurs responsables des modifications du taux de la désulfurase soluble, et étant donné la complexité des régimes du commerce employés, nous avons utilisé des régimes synthétiques de compositions bien définies, ayant en particulier des teneurs en protéines connues, et nous avons déterminé les taux d'enzymes obtenus chez les animaux soumis à ces régimes. Pour ce faire, les rats reçoivent tous pendant 8 jours au moins un régime à 18 % de caséine avant d'être placés à un autre régime synthétique dont la teneur en protéine est supérieure ou inférieure à 18 %.

D'après les résultats consignés dans le *Tableau III*, on constate que l'administration du régime B (18 % de caséine) provoque l'établissement d'un taux de désulfurase peu différent de celui obtenu chez les rats recevant le régime A (5 % de caséine); par contre, le régime C (60 % de caséine) conduit à un niveau d'enzyme nettement plus important. Nous avons récemment déterminé l'activité de la désulfurase soluble dans le foie de rats nourris depuis 6 jours avec un régime ne contenant pas de protéines et qui auparavant recevaient un régime synthétique à 18 % de caséine ; ces foies nous ont été aimablement fournis par le Docteur Hirsh, du Service du Professeur Halpern, à l'Hôpital Broussais. Nous avons observé que le niveau de l'enzyme dans ces foies est voisin de celui mesuré dans le foie de rats ayant reçu un régime à 5 ou 18 % de caséine.

Il semble donc qu'une teneur élevée en protéine (ou une teneur faible en hydrates de carbone) soit favorable à l'établissement d'un taux élevé d'enzyme. Quelle que soit l'explication de ce phénomène, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Goswami et coll. [33] : des poulets nourris pendant 3 semaines avec un régime riche en protéines ont un niveau de désulfuration dans le foie environ deux fois plus élevé que celui de poulets qui ont reçu un régime à 20 % de protéines. Signalons toutefois que les mesures effectuées par Goswami sont faites sur l'homogénat de foie entier.

D'autre part, Schimke [34] a étudié les modifications des taux des enzymes du cycle de l'urée dans le foie de rats soumis à des régimes dont les teneurs en protéines varient ; il a pu établir une relation proportionnelle entre la teneur en caséine des régimes et la teneur du foie en certains enzymes du cycle de l'urée. Il a aussi observé qu'après passage d'un régime à l'autre, ces mêmes enzymes s'adaptaient selon les diverses teneurs des régimes en protéines.

Cependant, si l'on rapproche les résultats obtenus avec les régimes synthétiques de ceux obtenus avec les régimes commerciaux, on cons-

TABLEAU III : Influence des régimes synthétiques ayant des teneurs variées en protéine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Même légende que *Tableau I*

Régime et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ml extrait enzymatique	µ moles H_2S/heure/g protéines		µmoles H_2S/heure/g foie frais	
				- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP
Sans protéine : 6 j. (6)	-	1,9	12,6	-	359 ± 16	-	13,6 ± 0,6
5 % caséine : 8 j. (3)	107	6,8	10,8	122 ± 14	303 ± 37	4,0 ± 0,5	9,8 ± 1,2
15 j.(3)	94	4,8	9,2	171 ± 19	378 ± 19	4,7 ± 0,5	10,8 ± 0,5
18 % caséine : 8 j. (6)	106	6,4	12,4	180 ± 10	372 ± 15	6,7 ± 0,4	13,8 ± 0,5
15 j.(3)	128	6,9	11,2	62 ± 14	277 ± 37	2,1 ± 0,5	9,3 ± 1,3
60 % caséine : 8 j. (3)	130	7,1	13,2	243 ± 8	657 ± 46	9,6 ± 0,3	26,0 ± 1,8
15 j.(3)	159	7,9	13,6	227 ± 13	828 ± 34	9,3 ± 0,5	33,8 ± 1,4

tate que les taux d'enzymes mesurés dans le foie de rats nourris avec les régimes synthétiques à 5 % et 18 % de caséine sont plus élevés que ceux mesurés dans le foie de rats nourris avec le régime « Causse », mais que les régimes « UAR-Entretien » et « UAR-Elevage », contenant 18 à 20 % de protéines, donnent des niveaux d'enzymes voisins de ceux établis par le régime synthétique à 60 % de caséine. La différence de teneur en protéines des régimes synthétiques et des régimes commerciaux ne peut donc rendre compte à elle seule des variations d'enzymes présents chez les animaux soumis à l'un ou l'autre de ces régimes ; mais les protéines sont de natures différentes dans les régimes commerciaux et dans les régimes synthétiques ; de plus, on sait qu'un régime à 18 % de caséine est considéré comme légèrement déficitaire en acides aminés soufrés [18]. Nous nous sommes demandés si la différence de taux d'enzyme observée entre les animaux recevant le régime B et le régime C était seulement due au fait que ce dernier est beaucoup plus riche en acides aminés soufrés. Nous avons donc déterminé quel est le niveau d'enzyme présent chez des animaux recevant le régime synthétique B, enrichi en méthionine.

3) Régime synthétique enrichi en méthionine

La méthionine est le précurseur de la cystathionine et de la cystéine puisqu'elle est à l'origine des réactions suivantes :

méthionine ⟶ S-adénosyl-méthionine ⟶ S-adénosyl-homocystéine ⟶ homocystéine (+ sérine) ⟶ cystathionine ⟶ cystéine

Nous avons donc ajouté au régime B (18 % de caséine), une quantité de DL-méthionine telle que la teneur totale en cet acide aminé soit identique à celle présente lorsque le régime contient 60 % de caséine. Les résultats groupés dans le *Tableau IV* montrent qu'il y a, après accroissement de la teneur en méthionine du régime, une augmentation du taux de l'enzyme, mais que ce phénomène est lent puisque l'augmentation n'est notable qu'après 3 semaines. Une teneur élevée en méthionine dans le régime joue donc un rôle favorable pour le niveau de l'enzyme, mais cependant l'addition de méthionine au régime B n'est pas suffisante pour établir un taux d'enzyme voisin de celui donné par un régime riche en protéines (régime C).

TABLEAU IV : Influence d'addition de DL-méthionine au régime B sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Même légende que *Tableau I*

Régime et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ml extrait enzymatique	µmoles H_2S/heure/g protéines		µmoles H_2S/heure/g foie frais	
				- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP
B : 12 j. (3)	152	7,5	12,0	120 ± 22	225 ± 10	4,3 ± 0,8	8,1 ± 0,4
B + méthionine : 7 j. (3)	174	9,0	11,6	169 ± 19	279 ± 21	5,9 ± 0,7	9,7 ± 0,7
B + méthionine : 20 j.(3)	178	6,8	11,2	247 ± 30	470 ± 45	8,3 ± 1	15,8 ± 1,5

4) Régime synthétique enrichi en cystine

Pour des raisons analogues à celles qui nous ont fait utiliser un régime enrichi en méthionine, nous avons donné aux animaux un régime additionné de L-cystine. Les résultats sont présentés dans le *Tableau V ;* nous constatons qu'après une addition de 0,5 % de

TABLEAU V : Influence d'addition de L-cystine au régime B sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Même légende que *Tableau I*

Régime et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ ml extrait enzymatique	µmoles H_2S/heure /g protéines (+ PLP)	µmoles H_2S/heure /g foie frais (+ PLP)
B : 12 jours (5)	130	7,1	11,6	314 ± 12,5	10,9 ± 0,4
B + cystine : 7 jours (5)	149	9,6	12,6	297 ± 33	11,2 ± 0,85
B + cystine : 12 jours (5)	191	10,6	12,1	420 ± 26	15,3 ± 0,9

Les rats utilisés au cours de cette expérience sont de souche Wistar WCF

cystine à un régime à 18 % de caséine, la désulfuration de la cystéine est augmentée dans le foie des rats soumis à ce régime, mais cette augmentation est lente puisqu'elle n'apparaît qu'après une dizaine de jours. L'addition de cystine au régime B ne peut donc rendre compte des différences observées entre les régimes du commerce et les régimes synthétiques d'une part, entre les activités enzymatiques provoquées par l'administration de ces régimes d'autre part.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA PYRIDOXINE

BRAUNSTEIN et AZARKH [35] ont observé, dès 1950, que la capacité de désulfuration d'homogénats de foies de rats carencés en vitamine B_6 est diminuée par rapport à celle mesurée chez des rats normaux. L'addition *in vitro* de phosphate de pyridoxal aux préparations enzymatiques obtenues à partir de foie de rats carencés en pyridoxine restaure en grande partie l'activité de l'enzyme [36]; le phosphate de pyridoxal a été alors considéré comme coenzyme de la désulfuration de la cystéine. Depuis, CHATAGNER et coll. [1] ont constaté que, dans l'homogénat de foie de rat, il existe deux systèmes enzymatiques de production d'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine, dont la localisation intra-cellulaire est différente, et que l'enzyme du système localisé dans la fraction soluble, c'est-à-dire la cystéine désulfurase « soluble » que nous étudions, est activée par l'addition *in vitro* de phosphate de pyridoxal. La cystéine désulfurase « soluble » a donc pour coenzyme le phosphate de pyridoxal ; ceci est en bon accord avec les résultats de MATSUO et GREENBERG [10] obtenus au cours de l'étude de la cystathionase.

Nous avons alors déterminé, d'une part l'effet provoqué, sur la cystathionase, par une carence en vitamine B_6, et d'autre part l'influence, également sur cet enzyme, d'injections de vitamine B_6.

1) Régime carencé en vitamine B_6

Les expériences ont été conduites de la manière suivante : un lot homogène de rats reçoit pendant 8 jours un régime synthétique à 18 % de caséine qui a été décrit dans les « *Techniques* ». Puis ces animaux sont séparés en deux groupes : le premier groupe continue à recevoir le régime complet, tandis que le second reçoit un régime analogue mais ne contenant pas de pyridoxine. Deux expériences de

ce type ont été réalisées : dans la première, les animaux sont sacrifiés après avoir reçu pendant 10 jours le régime dépourvu de pyridoxine ; dans la seconde, l'administration de ce régime est poursuivi pendant 3 semaines. Les résultats sont groupés dans le *Tableau VI*. Nous constatons qu'après 10 jours d'un régime carencé en vitamine B_6, l'activité endogène (mesurée sans addition de PLP *in vitro*) de la cystathionase a considérablement diminué, mais l'activité totale (mesurée en présence de PLP ajouté *in vitro*) n'est pas modifiée par rapport à celle des animaux témoins, c'est-à-dire que la réactivation par le phosphate de pyridoxal est totale. La diminution d'activité observée dans le premier groupe de mesures reflète seulement une diminution du phosphate de pyridoxal disponible et, d'après les résultats obtenus lorsque les mesures sont effectuées en présence de PLP, il semble qu'il n'y ait pas de modification de la synthèse de l'apoenzyme chez les animaux carencés.

Dans la deuxième série d'expériences au cours de laquelle les animaux sont soumis pendant 3 semaines à un régime dépourvu de vitamine B_6, l'activité endogène de la désulfurase est faible, de plus l'activité totale est diminuée par rapport à celle des animaux normaux : la réactivation par le phosphate de pyridoxal n'est plus que partielle, elle reste cependant très élevée par rapport à celle observée chez les animaux normaux.

Si l'on détermine les pourcentages de saturation et de stimulation par le phosphate de pyridoxal de l'apoenzyme de foie de rats carencés en vitamine B_6, nous constatons qu'ils sont différents de ceux obtenus pour l'apoenzyme de foie de rats normaux : quelle que soit la durée de la carence, le pourcentage de saturation est plus faible chez les rats carencés (20 à 22) que chez les rats témoins (33 à 37), le pourcentage de stimulation est, au contraire, plus élevé (345 à 395 au lieu de 170 à 200). Ceci suggère encore qu'une carence en pyridoxine ne supprime pas la synthèse de l'apoenzyme. Nous reviendrons sur ce point lors de la discussion générale de ces résultats.

2) Injections de pyridoxine

Greengard et Gordon [37] ont constaté que le taux de la transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique (TCT) dont le cofacteur est le PLP est, en quelques heures, augmenté dans le foie du rat à la suite d'injections de fortes doses de pyridoxine ; cette augmentation est accompagnée d'un accroissement du pourcentage de saturation de l'apotransaminase en phosphate de pyridoxal. Un phénomène analogue, mais de plus faible ampleur, a été observé par Chatagner et coll. [21] sur d'autres enzymes à phosphate de pyridoxal, dans des

conditions d'expériences différentes, la pyridoxine étant injectée pendant 8 jours à des doses beaucoup plus faibles.

Nous avons d'abord recherché l'effet provoqué sur la désulfurase soluble du foie de rat par des injections de doses massives de pyridoxine, les animaux étant sacrifiés quelques heures après ces injections. Le *Tableau VII* rend compte des résultats.

Dans une première série d'expériences, les rats utilisés sont nourris avec un régime synthétique à 18 % de caséine (B) et reçoivent en 5 heures 3 injections de 50 mg de vitamine B_6 pour 100 g de poids ; ils sont sacrifiés 1 heure après la dernière injection. Les activités enzymatiques sont mesurées en présence de PLP ajouté *in vitro*. Dans ces conditions, nous n'observons pas de modification de l'activité totale de la cystathionase. Nous avons, au cours de nouvelles déterminations, utilisé des animaux nourris au régime commercial « UAR-Elevage » qui donne un niveau de désulfuration plus élevé que celui obtenu avec le régime synthétique B ; ces animaux reçoivent soit 2 injections de 100 mg de pyridoxine pour 100 g de poids en 4 heures, et sont sacrifiés 1 heure après la dernière injection, soit 3 injections de 50 mg de pyridoxine pour 100 g de poids en 24 heures, ils sont tués alors 4 heures après la dernière injection. Les mesures des activités enzymatiques sont faites avec et sans addition de PLP *in vitro*.

Dans le premier cas (2 fois 100 mg en 4 heures), le niveau de la cystathionase, mesuré en présence de PLP, n'est pas modifié, mais, mesuré sans addition de PLP, il est augmenté de façon significative ; dans le deuxième cas (3 fois 50 mg en 24 heures), nous n'observons pas de modification du niveau de l'enzyme, que les mesures soient faites avec ou sans addition de PLP *in vitro*.

Il ressort donc de ces résultats que, dans les cas où les animaux reçoivent des injections de doses massives de pyridoxine et sont sacrifiés quelques heures après ce traitement, l'activité totale de la cystathionase n'est pas modifiée, mais que l'activité endogène peut être augmentée, c'est-à-dire que le pourcentage de saturation de l'enzyme est plus élevé chez ces animaux par rapport aux animaux normaux ; ces injections ont donc vraisemblablement accru la quantité de PLP du foie.

Nous avons ensuite injecté, pendant plusieurs jours, des doses faibles (50 μg/jour/100 g de poids) de vitamine B_6 à des rats nourris avec le régime commercial « Causse » et déterminé le niveau de l'enzyme en fonction du temps (*Tableau VIII*) : après 16 jours, nous observons une augmentation et de l'activité totale et de l'activité endogène de la désulfurase soluble.

TABLEAU VI : Influence d'une carence en vitamine B_6 sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Même légende que *Tableau I*

Modalités de l'expérience et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)		Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais		% saturation en coenzyme	% stimulation par le coenzyme
	au début de l'expérience	en fin d'expérience		- PLP	+ PLP		
RN *(8)	96	123,5	6,0	2,26 ± 0,18	6,78 ± 0,53	33,5	200
10 jours de carence RI (8)	99	112	6,6	1,28 ± 0,18	6,3 ± 0,7	20	395
RN (11)	78	187,5	9,4	3,33 ± 0,3	9,05 ± 0,37	37	172
3 semaines de carence RI (11)	77	127,5	7,2	1,21 ± 0,13	5,38 ± 0,55	22,5	345

* RN : rats normaux — RI : rats carencés en vitamine B_6

TABLEAU VII : Influence d'injections de fortes doses de pyridoxine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Même légende que *Tableau I*

Modalités de l'expérience	µmoles H_2S/heure/g foie frais			
	Rats témoins		Rats ayant reçu des injections	
	- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP
18 % de caséine (3 fois 50 mg en 5 h.)		15,15 ± 1,5 (3)*		14,35 ± 1,1 P ≫ 0,05** (4)
UAR-Elevage (2 fois 100 mg en 4 h.)	8,38 ± 0,6	23,55 ± 1,4 (4)	10,85 ± 0,7 0,02 < P < 0,05	24,95 ± 1,7 P ≫ 0,05 (4)
UAR-Elevage (3 fois 50 mg en 24 h.)	15,5 ± 0,3	33,5 ± 1,8 (6)	15,7 ± 0,5 P ≫ 0,05	31,5 ± 0,7 P ≫ 0,05 (5)

* nombre d'animaux utilisés pour l'expérience — ** P = facteur de probabilité

TABLEAU VIII : Influence d'injections de faibles doses de pyridoxine (50 µg par jour) sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Même légende que *Tableau I*

		RN * (3)	R I			
			3 jours (3)	10 jours (3)	16 jours (3)	23 jours (3)
µmoles H_2S/h/g foie frais	- PLP	4,05 ± 0,52	5,12 ± 0,35	6,53 ± 0,35	5,65 ± 0,33	9,7 ± 1,2
	+ PLP	7,94 ± 0,35	9,87 ± 0,5	13,60 ± 0,45	16,95 ± 0,54	18,5 ± 0,7

Dans cette expérience, les animaux sont nourris avec le régime « Causse ».

* RN = rats normaux — ** RI = rats ayant reçu des injections de pyridoxine

De cet ensemble de résultats, on peut donc conclure que la quantité de PLP disponible dans le foie est un facteur important pour le niveau d'activité de la cystathionase *in vivo*. On peut se demander si l'action du PLP se manifeste, étant donné que cette substance est cofacteur de l'enzyme, seulement sur *l'activité* de cet enzyme, c'est-à-dire si la vitesse de synthèse et la vitesse de dégradation de l'apocystathionase dans le foie sont indépendantes de la teneur de cet organe en PLP.

Jusqu'ici, une action du phosphate de pyridoxal ou de la pyridoxine sur la vitesse de synthèse de protéines douées d'activité enzymatique définie n'a jamais été décrite, c'est-à-dire que l'on ne connaît aucun exemple d'enzyme, et plus particulièrement d'enzyme à PLP, dont la vitesse de synthèse soit dépendante du PLP. Par contre, il a été établi, au moins chez *Streptococcus fæcalis* (souche R) [38], que des bactéries cultivées sur un milieu dépourvu de pyridoxine synthétisent l'apotyrosine décarboxylase.

De plus, le rôle protecteur du PLP contre la dénaturation de la cystathionase purifiée a déjà été mis en évidence [3, 4]. Nous avons, à notre tour, examiné le rôle du PLP lors de dénaturation thermique ménagée effectuée directement sur la fraction soluble du foie ; le protocole de l'expérience est décrit dans le chapitre des techniques. Les résultats sont portés dans la *figure 5* : les courbes RN 1 et RN 2 rendent compte du comportement de deux préparations enzymatiques au cours de la dénaturation thermique, la courbe R PLP de celui d'une préparation additionnée de PLP à la concentration $5 \cdot 10^{-3}$; nous constatons que, après 45 minutes de traitement, les activités résiduelles des deux premières préparations sont voisines et environ 1/5 de l'activité enzymatique de départ ; par contre, si l'enzyme est incubé en présence de son coenzyme, la pente de la droite est nulle : il n'y a pas eu de dénaturation de l'enzyme. Les résultats de ces dernières expériences sont particulièrement nets et font apparaître un rôle protecteur considérable du PLP contre la dénaturation thermique de l'apocystathionase.

On peut alors se demander si ce phénomène ne reflète pas également une protection de l'apocystathionase par le PLP contre des dénaturations autres que thermiques, c'est-à-dire si, en fait, la vitesse de dégradation de l'apoenzyme n'est pas diminuée lorsque la protéine est saturée en phosphate de pyridoxal et si, au contraire, l'apoenzyme dépourvu de son coenzyme n'est pas plus rapidement dégradé.

Les résultats obtenus au cours de l'étude de l'influence de la carence en pyridoxine ne sont pas en désaccord avec cette manière de voir ; en effet, après 10 jours de régime dépourvu de pyridoxine, si l'activité endogène de la cystathionase est nettement diminuée,

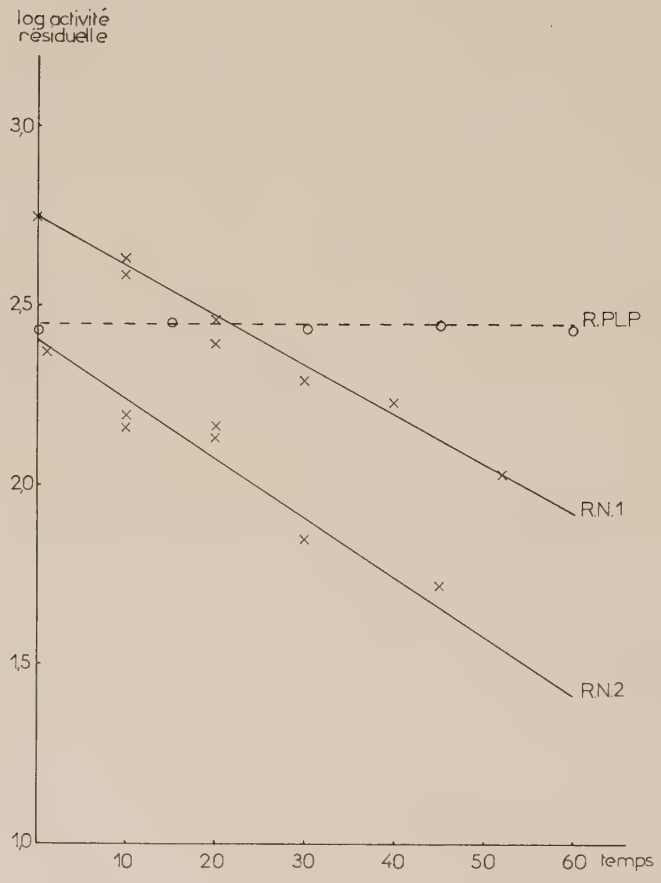

Fig. 5 : Dénaturation thermique de préparations de foies de rats incubés ou non avec du PLP

l'addition de PLP *in vitro* restaure une vitesse normale de désulfuration, ceci est en faveur d'une non-modification de la vitesse de synthèse de l'apoenzyme. Dans des préparations de foie d'animaux carencés pendant un temps plus long (3 semaines), la réactivation par le PLP n'est que partielle, toutefois le pourcentage de stimulation (345) reste du même ordre que dans le cas précédent (395) : lorsque la disponibilité en PLP est diminuée dans le foie, l'apoenzyme a tendance à disparaître.

Toutes ces observations conduisent à penser que le phosphate de pyridoxal, coenzyme de la cystathionase, n'est pas, au moins dans

certaines limites, nécessaire à la synthèse de la fraction protéique de cet enzyme, c'est-à-dire que la vitesse de synthèse de la cystathionase n'est modifiée ni chez des animaux carencés en vitamine B_6 depuis 2 à 3 semaines (et dans le foie desquels le taux de PLP est diminué d'environ 50 % par rapport au taux observé chez les animaux témoins) [39] ni chez des animaux qui ont reçu des injections de fortes doses de pyridoxine et dont le taux de PLP dans le foie est accru par ces traitements. Ces mêmes observations permettent de souligner le rôle protecteur extrêmement net du PLP contre la dénaturation thermique de la cystathionase, et ce fait porte à croire que le PLP exerce également un rôle protecteur contre la dégradation de l'enzyme. En conclusion, il apparaît que le phosphate de pyridoxal n'a pas d'action sur la vitesse de synthèse de l'apocystathionase, mais que la présence d'une quantité convenable de ce coenzyme dans le foie diminue la vitesse de dégradation de l'enzyme. A ce propos, il est de quelque intérêt de revenir sur un point souligné au début du chapitre sur l'influence des régimes, à savoir que le pourcentage de saturation *apparent* de la cystathionase en PLP dans une préparation de foie est voisin de 50 % chez les animaux normaux. Ce phénomène peut s'interpréter de deux manières : ou bien il y a eu dissociation du coenzyme de l'apoenzyme au cours de la préparation de l'extrait enzymatique, ou bien l'enzyme n'est pas saturé en coenzyme dans le foie. Afin de vérifier laquelle de ces hypothèses est exacte, nous avons effectué deux séries d'expériences. Dans la première, nous avons déterminé l'influence de la dilution, et pour ce faire, nous avons mesuré l'activité de la désulfurase soluble préparée dans les conditions habituelles et l'activité de l'enzyme préalablement dilué lors de sa préparation, soit avant, soit après la centrifugation ; l'expérience est réalisée de la façon suivante : d'une part, deux échantillons de 1 g de foie de rat provenant d'un animal nourri au régime à 18 % de caséine sont broyés dans une solution de saccharose et l'homogénat obtenu est ajusté à 3 ml dans le premier cas et à 6 ml dans le second, lequel est donc dilué 2 fois par rapport au premier. Les homogénats sont ensuite centrifugés et l'activité de la désulfurase soluble mesurée sur les deux préparations. Nous constatons (colonnes 1 et 2 du *Tableau IX*) que 1 ml de surnageant (S_2) obtenu à partir de l'homogénat le plus dilué donne une production d'H_2S qui est la moitié de celle déterminée sur 1 ml de l'autre surnageant (S_1), ceci que les mesures soient faites en présence ou en absence de PLP ajouté *in vitro*. D'autre part, un foie entier de rat prélevé sur un animal nourri au régime UAR-Elevage est broyé, l'homogénat est centrifugé, et la fraction soluble (S'_1) obtenue est diluée 2, 4 ou 10 fois, ce qui donne respectivement les échan-

tillons S'_2, S'_4 et S'_{10} ; les activités enzymatiques sont mesurées sur ces différentes fractions. Nous obtenons les résultats suivants exprimés en μg d'hydrogène sulfuré/heure/ml de préparation enzymatique) (*Tableau IX*).

TABLEAU IX

	I	II	III	IV	V	VI
	S_2	S_1	S'_1	S'_2	S'_4	S'_{10}
- PLP	55	114	290	132	75	
+ PLP	142	286	610	307	157	69
% saturation en coenzyme	38,5	40	47,5	43	47,5	

Même légende que *Tableau I*

D'après les nombres des colonnes III, IV, V et VI, on voit que 1 ml de préparation enzymatique diluée 2, 4 ou 10 fois donne une activité qui est la moitié, le quart ou le dixième de celle présente dans 1 ml de la préparation non diluée. De plus, quelle que soit la dilution, le pourcentage de saturation de l'apoenzyme en coenzyme est compris entre 35 et 50 : il n'y a pas eu augmentation de la dissociation du coenzyme par la dilution ; ce résultat est donc en faveur d'une non-saturation de l'apoenzyme dans le foie.

Dans la deuxième série d'expériences, nous avons comparé l'activité enzymatique d'un extrait de foie (*a*) préparé dans une solution de saccharose et celle d'un extrait de ce même foie (*b*) préparé dans une solution de saccharose additionnée de glutathion (10^{-2} M), de versène (10^{-2} M) et de phosphate de pyridoxal à raison de 33 μg par ml de saccharose, les mesures étant faites en présence ou en absence de PLP ajouté *in vitro*. De plus, nous avons également déterminé l'activité présentée par l'extrait enzymatique lorsque le milieu d'incubation contient, outre le PLP, du glutathion (10^{-2} M) et du versène (10^{-2} M); ces deux substances ont été utilisées étant donné que la cystathionase nécessite pour son activité la présence de groupements — SH libres [10]. Nous obtenons les résultats suivants :

D'après les nombres des colonnes II et III, nous voyons que ni le glutathion, ni le versène n'ont d'action sur l'activité de l'enzyme et que l'activité totale mesurée en présence de PLP ajouté *in vitro* n'est pas différente, que l'extrait enzymatique soit préparé dans une solution de saccharose additionnée ou non de PLP.

Par contre, l'activité, mesurée sans addition de PLP, de la préparation *b*, est très nettement supérieure à celle de la préparation *a*, ce qui s'explique par la présence de PLP dans le milieu de préparation de l'extrait *b*. Toutefois, cette activité n'est pas égale à celle que l'on obtient lorsque la mesure est faite en présence de PLP

	I	II	III
	- PLP	+ PLP	+ PLP + Glu + Versène
Prép. enzymatique a	4	10,4	10,3
Prép. enzymatique b	7,35	9,25	

ajouté *in vitro*. Il semble raisonnable d'envisager que la quantité de PLP (33 μg/ml) ajoutée à la solution de saccharose n'est pas suffisante pour saturer l'apoenzyme de la cystathionase, compte tenu du fait que d'autres protéines sont susceptibles de fixer aussi du PLP.

Ces résultats conduisent donc à penser que, dans le foie, l'apocystathionase n'est pas saturée en coenzyme.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE QUELQUES HORMONES ET DES SUBSTRATS DE L'ENZYME

En 1951, KNOX montra que le taux de la tryptophane pyrrolase (enzyme qui dégrade le tryptophane en formylcynurénine) était augmenté dans le foie de rats après injection à ces animaux de tryptophane ou d'hormones cortico-surrénaliennes [40]. Depuis, il a été observé que de nombreux autres enzymes des tissus d'animaux supérieurs sont sensibles à leur substrat d'une part, aux hormones surrénaliennes d'autre part [15, 41]; parmi les plus étudiés, on peut citer : la transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique (TCT) du foie de rat [19, 42], la xanthine-oxydase [43], la thréonine déhydrase [44, 45], la glucose-6-phosphatase [46]. Ces modifications ont été, au début, assimilées à un phénomène d' « induction » analogue à celui observé chez les bactéries ; en réalité, chez ces dernières, l'induction se traduit, après addition d'un substrat au milieu de culture, par l'apparition d'un nouvel enzyme qui dégrade ce substrat, alors que, dans les tissus animaux, l'enzyme « induit » est déjà présent, seul son niveau d'activité est modifié par le traitement imposé aux animaux. Sans préjuger des fondements de ces altérations des activités enzymatiques, il nous a paru intéressant de rechercher les répercussions provoquées sur le niveau de la cystathionase du foie chez des rats ayant reçu des injections de substrats de l'enzyme ou de diverses hormones.

Nous examinerons d'abord l'effet des hormones surrénaliennes, puis celui des hormones thyroïdiennes, et enfin celui de divers acides aminés.

INFLUENCE DES HORMONES SURRENALIENNES

1) Injections d'hydrocortisone

Dans une première série de déterminations, nous avons injecté de l'hydrocortisone à des rats mâles nourris avec le régime commercial « Causse » et constaté que, 4 heures après une injection de 12 mg de cette substance par 100 g de poids, le niveau de la désulfurase soluble du foie n'est pas modifié.

Nous avons entrepris de nouvelles expériences en utilisant les indications de GAVOSTO et coll. [20] (12 mg par jour et par 100 g de poids pendant 3 jours), qui, dans ces conditions, observent une forte augmentation des transaminases asparate-α-cétoglutarate et alanine-α-cétoglutarate du foie de rats traités à l'hydrocortisone. Nous obtenons les résultats suivants : 4 heures après la dernière injection d'hydrocortisone, l'activité endogène de l'enzyme extrait de foie de rats nourris avec le régime « Causse » n'est pas modifiée, mais l'activité totale est augmentée de façon significative. De même, l'activité totale de l'enzyme extrait de foie de rats soumis au régime UAR-Elevage et traités à l'hydrocortisone est accrue ; dans ce dernier cas les mesures sans addition de PLP *in vitro* n'ont pas été effectuées.

Par contre, dans les mêmes conditions, les injections d'hydrocortisone à des rats femelles sont sans effet sur l'activité endogène de l'enzyme, mais diminuent son activité totale ; cet ensemble de résultats est présenté dans le *Tableau X*.

Chez les rats mâles, l'hydrocortisone semble donc accroître le taux de l'apoenzyme « activable », tandis que chez les rats femelles, cette substance semble provoquer une diminution de ce taux. Nous n'avons pas, à l'heure actuelle, d'explication de cette différence d'action.

2) Surrénalectomie

La cystathionase étant sensible à l'injection d'hydrocortisone, nous avons recherché si l'ablation des glandes surrénales modifiait le niveau de cet enzyme ; les résultats sont présentés dans le *Tableau XI*. Nous avons constaté que, chez les rats mâles, la répercussion de l'ablation des glandes surrénales sur le taux de l'enzyme dépend du régime auquel sont soumis les animaux. Ainsi, lorsque les animaux reçoivent le régime du commerce « Causse » qui donne un niveau enzymatique peu élevé, la surrénalectomie entraîne une augmentation de celui-ci, quel que soit le poids des animaux, et ceci que les mesures soient

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux				µmoles H_2S/heure/g foie frais	
				- PLP	+ PLP
Rats mâles	Régime Causse	N *	(10)	5,12 ± 0,44	9,26 ± 0,7
		I	(10)	5,82 ± 0,16	14,5 ± 0,6
				P ≫ 0,05 **	P = 0,01
	Régime UAR-Elevage	N	(6)	-	21,6 ± 2,77
		I	(6)	-	28,7 ± 1,5
					0,01 < P < 0,02
Rats femelles	Régime Causse	N	(17)	6,7 ± 1,95	17,05 ± 1,15
		I	(27)	6,0 ± 1,5	13,4 ± 0,85
				P ≫ 0,05	0,001 < P < 0,01

TABLEAU X : Influence d'injections d'hydrocortisone sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

Même légende que *Tableau I.*

* N = rats normaux — I = rats ayant reçu des injections d'hydrocortisone (12 mg/100 g poids/jour pendant 3 jours) — ** P = facteur de probabilité

TABLEAU XI : Action de la surrénalectomie sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle en fonction du régime administré

Même légende que *Tableau I.*

* Nombre d'animaux utilisés pour l'expérience.

Régime	Poids des animaux (g)	Provenance des animaux	Rats normaux µmoles H_2S/heure/g de foie frais		Rats surrénalectomisés µmoles H_2S/heure/g de foie frais	
			- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP
Causse	90 à 120	AEC	2,8 ± 0,35	8 ± 0,5 (3)*	3,1 ± 0,01	10,2 ± 0,8 (3)
		Gif - WAG	5,3 ± 0,35	13,6 ± 0,7 (6)	8,1 ± 0,7	22,4 ± 1,6 (4)
	150 à 200	Gif - WAG	3,3 ± 0,35	7,7 ± 0,76 (3)	5,6 ± 0,18	14,1 ± 0,45 (3)
	200 à 250	Gif - WAG	3,7 ± 0,3	10,6 ± 1 (4)	5,6 ± 0,5	15,7 ± 0,48 (6)
UAR-Elevage	100 à 150	AEC	12,2 ± 0,9	29,5 ± 2,2 (3)	6,95 ± 0,2	19 ± 0,7 (3)
		Gif - WCF	10,5 ± 1,15	14,6 ± 1,2 (11)	11,5 ± 0,88	27,6 ± 0,1 (12)
	150 à 200	AEC	12,3 ± 0,35	22,2 ± 0,8 (9)	5,3 ± 0,2	11,5 ± 0,7 (8)
UAR-Entretien	150 à 200	AEC	11,0 ± 0,25	24,0 ± 0,8 (3)	8,1 ± 0,35	19 ± 0,85 (3)
		Gif - WAG	19,4 ± 0,6	38,3 ± 1,2 (3)	15,7 ± 0,3	33,7 ± 0,2 (4)
	250 à 300	AEC	6,7 ± 0,6	28,2 ± 1,1 (10)	3,2 ± 0,1	13 ± 1 (10)
18 % caséine	150 à 200	AEC	5,5 ± 0,95	12 ± 2,2 (5)	5,5 ± 0,45	13 ± 0,55 (5)

effectuées en présence ou en absence de PLP. Par contre, si les animaux sont nourris avec le régime « UAR-Elevage » ou « UAR-Entretien », qui provoquent l'établissement d'un taux d'enzyme élevé dans le foie, le niveau de la cystathionase n'est pas modifié ou a tendance à diminuer.

Au cours de cette expérience, nous avons utilisé des animaux provenant d'un autre élevage (AEC) : le comportement de ces derniers, après surrénalectomie, est voisin de celui des animaux provenant de Gif. L'effet de la surrénalectomie sur l'activité de la désulfurase soluble (cystathionase) semble donc dépendre essentiellement du régime auquel sont soumis les animaux.

Chez les rats femelles, nous n'observons pas de modification de la cystathionase du foie quelles que soient les conditions de régime adoptées.

A propos de l'influence de la surrénalectomie sur l'activité de la cystathionase en fonction des régimes administrés aux animaux, signalons que, sur d'autres enzymes, un phénomène analogue a été observé par Willmer et Foster [47] : ces auteurs ont étudié dans le foie de rat surrénalectomisé, le comportement de cinq enzymes qui interviennent dans le métabolisme des hydrates de carbone (glucose-6-phosphatase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, etc.); ils ont remarqué que l'activité de ces enzymes par rapport à celle mesurée chez les rats normaux est très différente selon le régime alimentaire administré aux animaux. De plus, Schimke [48] a constaté que, dans le foie du rat, les activités des enzymes du cycle de l'urée sont modifiées après ablation des surrénales, mais de manière plus ou moins importante selon la teneur en protéines du régime des animaux.

En ce qui concerne l'effet de l'hydrocortisone sur le niveau de l'enzyme, nous avons observé que cette action est lente (elle n'est notable qu'après 3 jours d'injection) par rapport à celle du cortisol sur la tryptophane pyrrolase [40] ou sur la transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique [42] du foie de rat dont les niveaux enzymatiques sont augmentés considérablement 5 heures après une seule injection. La cystathionase n'est cependant pas le seul enzyme à réagir après plusieurs jours de traitement ; la sérine déhydrase et la transaminase alanine-acide α-cétoglutarique, par exemple, sont augmentées après respectivement 2 jours et 3 jours [44, 20]. L'influence des hormones cortico-surrénaliennes sur l'activité de ces enzymes se manifeste donc de manière plus ou moins rapide, ceci peut peut-être s'expliquer par une différence entre les vitesses de renouvellement de ces enzymes : signalons à l'appui de cette manière de voir que les vitesses de renouvellement de la transaminase tyrosine-α-cétoglutarate et de la tryptophane pyrrolase sont particulièrement élevées [49].

INFLUENCE DES HORMONES THYROIDIENNES

L'influence des hormones thyroïdiennes sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat a été étudiée au laboratoire par CHATAGNER et coll. [50]. Rappelons seulement que des injections de fortes doses de thyroxine provoquent, au bout de quelques jours, une nette diminution de l'activité de la désulfurase soluble et que l'addition de PLP *in vitro* à des préparations de foie de rats thyrotoxiques ne restaure que partiellement l'activité. Rappelons aussi que l'activité de l'enzyme obtenue à partir de foie de rats thyroïdectomisés est fortement augmentée, ceci que les mesures soient faites en présence ou en absence de PLP. D'autre part, les pourcentages de saturation et de stimulation par le PLP de ces enzymes restent voisins de ceux déterminés dans le foie de rats normaux.

Il a été constaté [51] que les hormones thyroïdiennes provoquent des modifications significatives du taux de coenzyme dans le foie, modifications qui vont dans le même sens que les variations des niveaux des activités enzymatiques mais qui sont de plus faible ampleur : le mécanisme de la régulation de l'activité de ces enzymes par les hormones thyroïdiennes ne semble donc pas pouvoir s'expliquer par l'intermédiaire des seules variations de la quantité de coenzyme ; il a été envisagé [52] que les hormones thyroïdiennes ont aussi une influence sur l'apoenzyme en affectant soit sa vitesse de synthèse, soit sa vitesse de dégradation.

Afin de contrôler cette manière de voir, nous avons recherché si un inhibiteur de la synthèse protéique empêche *in vivo* l'augmentation de l'activité de la désulfurase soluble chez les animaux thyroïdectomisés. Pour ce faire, nous avons injecté de la puromycine à des animaux privés de leurs glandes thyroïdiennes.

1) Injections de puromycine

L'expérience est réalisée de la façon suivante : des rats sont thyroïdectomisés ; quatre jours après l'opération, ces animaux sont répartis en deux groupes homogènes. Ceux du premier lot reçoivent pendant quatre jours une injection de 5 mg de puromycine par 100 g de poids et par jour et ils sont sacrifiés quatre heures après la dernière injection ; ceux du deuxième lot servent de témoins et sont sacrifiés en même temps que les animaux du premier lot. L'activité enzymatique de la désulfurase soluble est déterminée dans le foie de chaque animal. Nous avons aussi mesuré le niveau de l'enzyme

chez quelques animaux normaux du même arrivage. Nous obtenons les résultats suivants (*Tableau XII*) : le niveau de l'enzyme est considérablement augmenté chez les animaux thyroïdectomisés par rapport aux animaux normaux ; cette augmentation est d'une ampleur beaucoup plus faible chez ces animaux thyroïdectomisés ayant reçu des injections de puromycine. L'effet de la thyroïdectomie sur l'activité de l'enzyme est donc fortement diminué par la puromycine.

TABLEAU XII : Influence d'injections de puromycine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rats thyroïdectomisés

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µ moles H_2S/heure/g foie frais (+ PLP)
RN * (5)	220	8,3	32,5 ± 2,1
R thy. (5)	205	7,2	46,9 ± 1,4
R thy. + pur. (5)	182	5,15	38,4 ± 2

Les animaux utilisés au cours de cette expérience sont de souche Wistar WCF ; ils sont nourris avec le régime UAR-Entretien.

Même légende que *Tableau I.*

* RN = rats normaux — R thy. = rats thyroïdectomisés — R thy. + pur. = rats thyroïdectomisés et ayant reçu des injections de puromycine (5 mg/100 g rat/jour pendant 4 jours).

Signalons que si dans cette expérience, l'action de la puromycine sur le niveau de l'enzyme du foie de rat normal n'a pas été examinée, elle l'a été dans une autre, dont les résultats (*Tableau XXVIII*) nous montrent que cette substance ne modifie pratiquement pas l'activité de l'enzyme chez des animaux normaux. Les conditions que nous utilisons ici (5 mg de puromycine par 100 g de rat et par jour pendant 4 jours) sont très voisines de celles indiquées par WEBER et coll. [26] : ces auteurs injectent à des rats ces mêmes quantités mais pendant 3 jours seulement et observent une inhibition de l' « induction » par le cortisol de la glucose-6-phosphatase et de la fructose-1-6-diphosphatase du foie.

Ces résultats sont donc nettement en faveur d'une modification de la vitesse de synthèse de l'apocystathionase sous l'influence des hormones thyroïdiennes ; chez les animaux thyroïdectomisés, il y aurait accroissement de la vitesse de synthèse de l'enzyme ; chez les animaux thyrotoxiques, diminution de cette vitesse.

2) Influence d'une carence en pyridoxine

Nous avons émis, dans le chapitre précédent, l'hypothèse selon laquelle le phosphate de pyridoxal agirait sur la stabilité de l'apoenzyme, c'est-à-dire en fait sur sa vitesse de dégradation ; nous venons de voir que, en revanche, les hormones thyroïdiennes modifiaient probablement la vitesse de synthèse. Il nous a paru intéressant de rechercher quelle pouvait être la répercussion d'une carence en vitamine B_6 sur l'action de la thyroïdectomie. L'expérience est conduite de la façon suivante : un lot de rats femelles est mis pendant une huitaine de jours à un régime à 18 % de caséine (B); les animaux sont ensuite répartis en 5 groupes. Le premier est gardé au régime B, le deuxième est placé à un régime analogue au régime B, mais dépourvu de pyridoxine. Les rats du troisième groupe sont thyroïdectomisés et maintenus au régime B pendant encore une dizaine de jours ; les animaux du quatrième sont thyroïdectomisés dix jours après avoir été soumis au régime dépourvu de pyridoxine et sont conservés à ce même régime carencé pendant 10 jours après l'opération. Les animaux du groupe 5 reçoivent une injection de thyroxine par jour pendant 8 jours et sont soumis au régime B.

Nous obtenons les résultats suivants (*Tableau XIII*) : les niveaux de désulfuration sont plus élevés chez les rats thyroïdectomisés et carencés en vitamine B_6 (groupe 4) que chez les rats carencés non thyroïdectomisés (groupe 2), mais moins élevés toutefois que chez les rats thyroïdectomisés et soumis au régime complet (groupe 3). L'activité de l'enzyme extrait de foie de rats thyroxiques (groupe 5) est fortement diminuée par rapport à celui des animaux normaux (groupe 1), ce qui est en accord avec les résultats signalés au début de ce chapitre.

Une carence en vitamine B_6 diminue donc l'ampleur de l'effet de la thyroïdectomie sur l'activité de la cystathionase mais ne supprime pas cet effet.

Les résultats obtenus lors de ces deux dernières expériences, ainsi que ceux observés lors de l'étude de l'influence de la pyridoxine sur la cystathionase sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les hormones thyroïdiennes agiraient sur la vitesse de synthèse de l'enzyme, tandis que la pyridoxine modifierait sa vitesse de dégradation. Signalons que dans le cas où une carence en pyridoxine est surimposée à la thyroïdectomie, l'effet de cette dernière apparaît comme prédominant puisque l'activité de la cystathionase est plus élevée chez ces animaux que chez des rats carencés en vitamine B_6 mais non

thyroïdectomisés, et plus élevée aussi que chez des rats normaux, les mesures étant faites dans ce dernier cas, en présence de PLP ajouté *in vitro*, ce qui reflète la quantité totale d'apoenzyme.

TABLEAU XIII : Action simultanée d'une carence en pyridoxine et de la thyroïdectomie sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais	
			- PLP	+ PLP
Groupe :				
1 - 18 % (6)	111	6,0	6,32 ± 0,48	13,4 ± 0,54
2 - 18 % - B_6 (4)	108	5,4	1,07 ± 0,36	7,14 ± 1,19
3 - 18 % thyroïdect. (6)	100	5,1	13,9 ± 0,46	28 ± 1,2
4 - 18 % - B_6 thyroïdect. (5)	102	5,5	4,46 ± 1,9	16,65 ± 0,76
5 - 18 % + inj. de thyroxine (500 µg/j./rat pendant 8 jours) (5)	142	5,6	2,25 ± 0,5	5,4 ± 0,43

Même légende que dans *Tableau I.*

18 % = animaux ayant reçu un régime à 18 % de caséine pendant 21 jours — 18 % — B_6 = animaux ayant reçu un régime à 18 % de caséine dépourvu de vitamine B_6 pendant 21 jours.

INFLUENCE DES SUBSTRATS

La cystathionase est un enzyme multifonctionnel susceptible de dégrader plusieurs acides aminés [10]. Nous avons choisi d'injecter d'abord de la cystéine, car c'est avant tout la cystéine désulfurase que nous étudions.

1) Injection de L-cystéine

De la L-cystéine (3,3 mmoles/kg animal, soit environ 50 mg/100 g) injectée à des rats mâles ou femelles ne modifie pas, quelques heures après ce traitement, le taux de la cystathionase du foie (*Tableau XIV*); lorsque les quantités de cystéine (100 à 200 mg/100 g animal) injectées sont plus élevées, nous n'observons pas non plus de modifications du taux de l'enzyme.

Nous avons essayé de pratiquer des injections pendant plusieurs jours, mais la cystéine est toxique et entraîne la mort des animaux.

Goswami et coll. [33] ont observé une augmentation de la désulfhydrase de la cystéine dans le foie de poulet en administrant à ces derniers de la cystéine pendant 4 jours ; mais la source d'enzyme employée par ces auteurs est un homogénat total du foie de poulet, alors que nous étudions l'enzyme de la fraction soluble.

2) Injection de DL-homosérine

Nous avons recherché si un des autres substrats de la cystathionase est susceptible de modifier le niveau de l'enzyme ; d'après Matsuo et Greenberg [10], l'homosérine est le meilleur substrat, aussi avons-nous injecté de la DL-homosérine (6,6 mmoles/kg rat) à des rats mâles et femelles et mesuré parallèlement la désulfuration de la cystéine et la désamination de l'homosérine (*Tableau XV*).

Quel que soit le régime auquel sont soumis les animaux (Causse ou UAR-Elevage), nous observons une augmentation très significative de la désulfuration de la cystéine et de la désamination de l'homosérine, les mesures étant faites en présence de phosphate de pyridoxal ajouté *in vitro*. Précisons que ce phénomène a été observé uniquement chez les rats mâles ; dans le foie des rats femelles, le niveau de la cystathionase n'est pas modifié par des injections d'homosérine. Nous n'avons pas actuellement d'explication de cette différence de comportement suivant le sexe de l'animal. Toutefois, nous n'avons pas non plus observé de variation de niveau de l'enzyme chez les rats femelles ovariectomisés et ayant reçu des injections de DL-homosérine par rapport à celui de rats femelles ovariectomisés non traités.

3) Injection de L-méthionine

Etant donné que la méthionine donne naissance à de la cystathionine dans les tissus animaux et que, ajoutée à un régime à 18 % de caséine, elle augmente au bout d'un certain temps le niveau de la cystathionase du foie de rat, nous avons pensé qu'il serait intéressant de voir quelle est l'action provoquée sur l'enzyme par des injections de méthionine. Dans les régimes, nous avons ajouté de la DL-méthionine, pour les injections, nous utiliserons la L-méthionine ; en effet, étant donné la faible solubilité de la méthionine, l'emploi de DL-méthionine conduit à injecter aux animaux des volumes trop grands.

TABLEAU XIV : Influence d'une injection de L-cystéine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

Modalités de l'expérience nombre d'animaux		Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais	
				- PLP	+ PLP
Rats mâles	RN * (5)	81	5,3	3,45 ± 0,45	10,5 ± 1,8
	RI (7)	84	5,5	3,15 ± 0,15 P ≫ 0,05 **	12 ± 0,45 P ≫ 0,05
Rats femelles	RN (3)	161	7,9	2,85 ± 0,45	9,6 ± 0,75
	RI (3)	162	8,7	2,1 ± 0,45 P ≫ 0,05	8,85 ± 0,9 P ≫ 0,05

Dans cette expérience, les rats utilisés sont nourris avec le régime « Causse ».
Même légende que dans *Tableau I.*
* RN = rats normaux — RI = rats ayant reçu une injection de L-cystéine (3,3 mmoles/kg d'animal) — ** P = facteur de probabilité.

TABLEAU XV : Influence d'une injection de DL-homosérine sur l'activité de la cystathionase du foie de rat mâle

Modalités de l'expérience		Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais	
Régime	Traitement imposé aux animaux			- PLP	+ PLP
Causse	RN * (15)	107	5,9	4,2 ± 0,6	11,7 ± 0,3
	RI (13)	112	5,8	6,0 ± 0,3	17,1 ± 0,6
				0,02 < P < 0,05**	P < 0,001
UAR-Elevage	RN (5)	119,5	5,3	10,6 ± 1,1	26,0 ± 1,1
	RI (4)	135	6,0	12,2 ± 0,2	30,4 ± 1,6
				P≫ 0,05	0,02 < P < 0,05
				µmoles NH_3/heure/g foie frais ***	
				- PLP	+ PLP
Causse	RN (8)	93	5,7	45 ± 6	67,5 ± 6
	RI (8)	93	5,3	66 ± 6	87,0 ± 7,5
				P = 0,02	0,02 < P < 0,05

Même légende que dans *Tableau I.*
* RN = rats normaux — RI = rats ayant reçu une injection d'homosérine (6,6 mmoles/kg d'animal) — ** P = facteur de probabilité — *** quantité de NH_3 formée, l'homosérine étant substrat de la réaction.

Des nombres du *Tableau XVI,* il ressort qu'une seule injection de 3,3 mmoles par kg rat de L-méthionine à des rats mâles augmente rapidement le taux de la désulfurase soluble.

TABLEAU XVI : Influence d'une injection de L-méthionine sur l'activité de la cystathionase du foie de rat mâle

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	μ moles H_2S/heure/g foie frais (+ PLP) *
RN * (6)	81	4,4	9,0 ± 0,6
RI (8)	77	3,9	13,05 ± 1,05
			P = 0,01
			μ moles NH_3 **/heure/g foie frais (+ PLP)
RN (7)	83	4,4	69,0 ± 4,5
RI (7)	88	4,4	96,0 ± 9,0
			P = 0,01

Dans cette expérience, les animaux sont nourris avec le régime « Causse ».
Même légende que dans *Tableau I.*
* RN = rats normaux — RI = rats ayant reçu une injection de L-méthionine (3,3 mmoles/kg d'animal) — ** Quantité de NH_3 formée, l'homosérine étant substrat.

4) Injection d'autres acides aminés

Afin de contrôler si les modifications du taux de la cystathionase observées après une injection de L-méthionine ou de DL-homosérine ne sont pas le résultat d'un « stress » non spécifique, dû à une décharge d'hormones surrénaliennes provoquée par l'injection, nous avons utilisé d'autres acides aminés n'ayant pas de rapport apparent avec la cystéine. D'après les résultats présentés dans le *Tableau XVII,* il ressort que des injections de L-alanine ou de DL-tryptophane à des rats ne modifient pas la désulfuration de la cystéine dans le foie. L'augmentation de l'activité de la cystathionase du foie de rat mâle après une injection de L-méthionine ou de DL-homosérine n'est donc pas due à un « stress » non spécifique. Toutefois, il nous a semblé utile de rechercher si cette augmentation est liée à la présence des glandes surrénales, puisque l'hydrocortisone provoque elle aussi un accroissement du niveau de l'enzyme.

TABLEAU XVII : Influence d'injections de L-alanine ou de DL-tryptophane sur la cystathionase du foie du rat mâle

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux		Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais (+ PLP)	µmoles NH_3 *** /heure/g foie frais (+ PLP)
RN **	(9)	84	4,9	13,05 ± 0,6	58,5 ± 3,6
RI Ala	(6)	72	4,5	11,55 ± 0,75	54 ± 6
				P ≫ 0,05 *	P ≫ 0,05
RI Try	(6)	83,5	4,9	11,5 ± 0,9	61,5 ± 3,5
				P ≫ 0,05	P ≫ 0,05

Dans cette expérience, les animaux sont nourris avec le régime « Causse ».

Même légende que dans *Tableau I.*

* P = facteur de probabilité — ** RN = rats normaux — RI = rats ayant reçu une injection d'alanine (3,3 mmoles/kg animal) ou de tryptophane (6,6 mmoles/kg d'animal) — *** Quantité de NH_3 formé, l'homosérine étant substrat.

5) Injection de DL-homosérine à des rats surrénalectomisés

Nous avons recherché si les modifications observées après une injection de DL-homosérine ont encore lieu chez des animaux surrénalectomisés.

Deux séries d'expériences ont été effectuées ; dans la première, les animaux sont nourris avec le régime « UAR-Elevage » : la surrénalectomie ne modifie sensiblement pas le niveau de l'enzyme par rapport aux animaux témoins. Dans la deuxième expérience, les animaux ont reçu le régime « Causse » : les animaux surrénalectomisés ont un niveau d'enzyme supérieur aux animaux normaux.

Les résultats sont présentés dans le *Tableau XVIII* : il ressort que des rats surrénalectomisés et injectés d'homosérine ont des niveaux d'enzymes voisins de ceux mesurés chez des rats surrénalectomisés non injectés. La présence des glandes surrénales est donc nécessaire à l'action de l'homosérine.

TABLEAU XVIII : Influence d'une injection de DL-homosérine sur l'activité de la désulfurase soluble de foie de rats mâles surrénalectomisés

		RN * (5)	RH (4)	RS (4)	RS + H (5)
Régime UAR-Elevage	- PLP	10,6 ± 1,1	12,15 ± 0,2 P ≫ 0,05 **	10,85 ± 0,07	11,3 ± 1,0
	+ PLP	26,0 ± 1,15	30,4 ± 1,6 0,02 < P < 0,05	27,4 ± 0,95	25,75 ± 1,9 P ≫ 0,05
µmoles H_2S/heure/ g foie frais		RN * (6)		RS (4)	RS + H (5)
Régime Causse	- PLP	5,3 ± 0,35		8,1 ± 0,7	9,0 ± 0,4
	+ PLP	13,6 ± 0,7		22,4 ± 1,6	24,7 ± 1,95 P ≫ 0,05

Même légende que dans *Tableau I.*

* RN = rats normaux — RS = rats surrénalectomisés — RH = rats ayant reçu une injection d'homosérine (6,6 mmoles par kg d'animal) — RS + H = rats surrénalectomisés ayant reçu une injection d'homosérine — ** P = facteur de probabilité.

La cystathionase n'est pas le seul enzyme dont l' « induction » par le substrat dépend des glandes surrénales : la transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique [42] est augmentée dans le foie de rats normaux, après une injection de tyrosine à ces animaux ; mais cette modification n'est plus observée chez des rats surrénalectomisés. Par contre, le niveau de la tryptophane pyrrolase du foie de rat est considérablement accru après une injection de tryptophane aussi bien chez des animaux normaux que chez des animaux surrénalectomisés [53].

CHAPITRE IV

INFLUENCE D'INJECTIONS D'ANTIMETABOLITES

Nous avons vu, dans un précédent chapitre, que l'activité de la cystathionase est augmentée dans le foie du rat après une injection de DL-homosérine ou de L-méthionine et que cette augmentation semble être le résultat d'un « stress » spécifique. Nous nous sommes demandé si cet accroissement du taux de l'enzyme reflétait une accumulation dans le foie de la protéine enzymatique synthétisée *de novo* ou seulement l'activation d'un précurseur déjà présent. Pour préciser laquelle de ces hypothèses semble exacte, nous avons recherché si l'injection d'un substrat provoque encore une augmentation de l'activité de l'enzyme chez un animal dont la synthèse protéique est perturbée à la suite de traitements par des antimétabolites, tels que la 8-azaguanine et le 5-fluorouracile qui interfèrent avec le métabolisme des acides nucléiques.

1) Injections de 8-azaguanine

La 8-azaguanine est un analogue de la base purique guanine ; elle agirait en remplaçant la guanine dans le RNA soluble [54].

Nous avons donc injecté de la 8-azaguanine (40 mg en 24 heures) à des rats mâles et déterminé l'effet produit chez ces animaux par une injection de DL-homosérine. Rappelons que, d'après Kvam et Parks [22], de telles injections de 8-azaguanine suppriment l'augmentation des activités enzymatiques de la tryptophane pyrrolase et de la glucose-6-phosphatase du foie de rat, provoquée par une injection d'hydrocortisone.

Nous avons obtenu les résultats suivants (*Tableau XIX*) : chez les animaux ayant reçu deux ou trois injections de 8-azaguanine, une injection de DL-homosérine ne modifie plus le niveau de la désulfuration de la cystéine, ni celui de la désamination de l'homosérine dans le foie (les mesures sont effectuées en présence de PLP ajouté *in vitro*).

Ceci conduit à exclure la seconde hypothèse, à savoir l'activation d'un précurseur, et serait plutôt en faveur d'une accumulation de la cystathionase dans le foie, sous l'effet de l'homosérine.

2) Injections de 5-fluorouracile

Le 5-fluorouracile aurait une double action et sur la synthèse des acides nucléiques et sur la formation d'acide thymidilique [23].

Ainsi cette substance inhibe partiellement l' « induction » par le tryptophane de la tryptophane pyrrolase du foie de rats et de cobayes [55].

Nous avons donc injecté à des rats mâles une solution de 5-fluorouracile à raison de 2 injections de 25 mg par 100 g de poids ; la moitié de ces animaux reçoivent, de plus, en même temps que la dernière injection de 5-fluorouracile, une injection de DL-homosérine. Quatre heures après ce traitement, les animaux sont sacrifiés et les activités enzymatiques déterminées. Des résultats présentés dans le *Tableau XX*, il ressort que les niveaux de désulfuration chez les rats normaux, chez les rats injectés de 5-fluorouracile et de DL-homosérine sont peu différents, ceci que les mesures soient faites en présence ou en absence de PLP ajouté *in vitro*.

L'homosérine ne provoque donc plus d'augmentation de l'activité de l'enzyme chez des rats traités au 5-fluorouracile.

Ce dernier résultats est en bon accord avec celui obtenu après des injections de 8-azaguanine et exclut, lui aussi, l'activation d'un précurseur présent dans le tissu hépatique.

Récemment, Schimke, Sweeney et Berlin [56] ont étudié de manière très élégante la cinétique de l'induction de la tryptophane pyrrolase du foie de rat par le tryptophane d'une part, par l'hydrocortisone d'autre part, et ils ont conclu de leurs résultats que les hormones cortico-surrénaliennes agiraient au niveau de la vitesse de synthèse de l'enzyme, le substrat et les cofacteurs intervenant au niveau de sa vitesse de dégradation. Il semble de quelque intérêt de déterminer dans quelle mesure les résultats obtenus sur la cystathionase, lorsque le niveau de cet enzyme est modifié sous l'influence de facteurs hormonaux ou nutritionnels, sont en accord avec cette manière de voir. Nous avons tout lieu de penser que les hormones thyroïdiennes agiraient effectivement sur la vitesse de synthèse de l'enzyme, vitesse qui serait augmentée chez l'animal thyroïdectomisé et diminuée chez l'animal thyrotoxique. De plus, lorsqu'une carence en vitamine B_6 est surimposée à la thyroïdectomie, les résultats que nous avons obtenus sont également en bon accord avec les propo-

TABLEAU XIX : Influence d'une injection de DL-homosérine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle traité par la 8-azaguanine

	RN * (9)	RAz (10)	RAz + H (10)
µmoles H_2S/heure/g foie frais (+ PLP)	20,7 ± 1,8	21,1 ± 1,8	19,3 ± 1,0 P ≫ 0,05
µmoles NH_3 ** /heure/g foie frais (+ PLP)	78,0 ± 6,9	84,0 ± 7,8	76,5 ± 7,5 P ≫ 0,05

Dans cette expérience, les animaux sont nourris avec le régime « Causse ».

Même légende que dans *Tableau I.*

P = facteur de probabilité — * RN = rats normaux — RAz = rats ayant reçu des injections de 8-azaguanine (2 fois 20 mg/100 g d'animal) — RAz + H = rats ayant reçu des injections de 8-azaguanine et de DL-homosérine — ** Quantité de NH_3 formée au cours de la réaction, l'homosérine étant utilisée comme substrat.

TABLEAU XX : Influence d'une injection de DL-homosérine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle traité par le 5-fluorouracile

		RN * (10)	RF (10)	RF + H (10)
µmoles H_2S/heure/g foie frais	- PLP	5,8 ± 0,5	6,5 ± 0,8	6,6 ± 0,8 P ≫ 0,05 **
	+ PLP	15,2 ± 1,1	16,2 ± 1,5	17,1 ± 1,6 P ≫ 0,05

Dans cette expérience, les animaux sont nourris avec le régime « Causse ».

Même légende que dans *Tableau I.*

* RN = rats normaux — RF = rats ayant reçu des injections de 5-fluorouracile (2 fois 25 mg/100 g d'animal) — RF + H = rats ayant reçu des injections de 5-fluorouracile et DL-homosérine — ** P = facteur de probabilité.

sitions de SCHIMKE et coll. [56]. En ce qui concerne l'effet des substrats ou d'un précurseur de substrats (DL-homosérine, L-méthionine) chez les animaux normaux, on pourrait envisager que leur présence retarde la vitesse de dégradation de la cystathionase, ce qui expliquerait l'augmentation du taux de l'enzyme. Cette interprétation est elle aussi en accord avec les hypothèses de SCHIMKE et coll. Par contre, étant donné que l'effet de l'homosérine nécessite la présence des glandes surrénales puisque cette substance ne provoque plus une augmentation du niveau de l'enzyme chez le rat surrénalectomisé, les hypothèses de SCHIMKE et coll. ne peuvent dans ces derniers cas être appliquées à la cystathionase. Rappelons que l'activité de la transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique est augmentée dans le foie de rats normaux, 4 heures après une injection de tyrosine (substrat de l'enzyme) à ces animaux et que cette augmentation n'apparaît plus si les animaux sont privés de leurs glandes surrénales. Le comportement de cet enzyme est donc comparable à celui de la cystathionase, tout au moins en ce qui concerne l'action des substrats ; les propositions de SCHIMKE et coll. ne peuvent donc se généraliser.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE L'ETHIONINE

ACTION DE L'ETHIONINE « IN VIVO »

Nous avons également recherché dans quelle mesure l'influence de l'homosérine peut être observée chez des animaux dont la synthèse protéique est perturbée par un autre type d'antimétabolite, à savoir l'éthionine [57]. Nous avons donc injecté de la DL-homosérine (6,6 mmoles/kg d'animal, 4 h avant le sacrifice) à des rats mâles qui avaient déjà reçu des injections de DL-éthionine (3 fois 75 mg/100 g poids en 24 h). Nous avons obtenu les résultats suivants : il n'y a pas de différence entre le taux de l'enzyme du foie de rat traité à l'homosérine et à l'éthionine et celui de l'enzyme du foie de rat traité à l'éthionine seule, mais on constate une augmentation du taux de l'enzyme chez les animaux injectés d'éthionine par rapport aux animaux normaux. Bien que cette augmentation ne soit pas spectaculaire, il nous a semblé utile de contrôler ce phénomène qui paraissait quelque peu surprenant.

Nous avons donc entrepris deux séries d'expériences ; dans la première, l'activité de la cystathionase est mesurée dans le foie de rats soumis à des régimes synthétiques dont la teneur en caséine est variable et qui contient de la DL-éthionine, dans la seconde les mesures sont faites sur des foies provenant d'animaux qui ont reçu une injection de 3,3 mmoles de L-éthionine par kg d'animal 4 heures avant le sacrifice. Les résultats sont présentés dans les *Tableaux XXI, XXII* et *XXIII*.

Des nombres des *Tableaux XXI* et *XXII*, il ressort très nettement que et la production d'H_2S à partir de cystéine et la production de NH_3 à partir d'homosérine sont augmentées dans le foie de rats mâles et dans le foie de rats femelles dont le régime est additionné de DL-éthionine, ceci que les mesures soient faites en l'absence ou présence de PLP ajouté *in vitro*.

TABLEAU XXI : Influence d'addition de DL-éthionine aux régimes synthétiques sur l'activité de la cystathionase du foie du rat

Régimes et nombre d'animaux		Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ml extrait enzymatique	µmoles H_2S/heure/g protéines		µmoles H_2S/heure/g foie frais		µmoles H_2S/h foie total (+PLP)
					- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP	
Rats mâles	A 15 j.(3)	94	4,8	9,2	171±19	378±19	4,7±0,5	10,8±0,5	50
	A + Eth. 8 j.(6)	60	2,3	9,9	-	1115±41	-	33,1±1,2	76,2
Rats femelles	A 8 j.(5)	80	3,6	11,9	-	460±14	-	16,4±0,5	58,3
	A + Eth. 8 j.(6)	59	2,0	11,5	-	860±63	-	29,7±0,2	59,4
Rats mâles	B 8 j.(6)	106	6,4	12,4	180±10	372±15	6,7±0,4	13,8±0,5	88,3
	B + Eth. 8 j.(6)	85	3,0	10,4	683±118	1383±95	21,3±0,4	43,2±0,3	129,6
Rats femelles	B 15 j.(3)	132	6,3	14,0	251±64	473±38	10,6±2,7	19,8±1,6	125,0
	B + Eth. 8 j.(3)	116	4,1	11,2	341±30	1115±51	11,4±1,0	37,5±1,7	154,0
Rats mâles	C 10 j.(3)	164	6,0	14,8	250±21	795±38	11,1±0,9	35,3±1,7	211,8
	C + Eth.19 j.(3)	99	4,7	12,8	975±78	1197±168	37,4±0,3	46,0±6,4	216,0
Rats femelles	C 8 j.(3)	130	6,3	12,9	352±36	551±97	13,6±1,4	21,3±3,8	134,4
	C + Eth.18 j.(3)	84	3,1	11,7	817±45	1143±71	28,7±1,6	40,2±2,5	124,4

Dans cette expérience, le substrat est la L-cystéine.

Même légende que dans *Tableau I ;* la quantité d'éthionine ajoutée dans chaque régime est précisée dans les « Techniques ».

TABLEAU XXII : Influence d'addition de DL-éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

Régimes		Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	mg protéines/ml extrait enzymatique	µmoles NH_3/h/g protéines (+ PLP)	µmoles NH_3/h/g foie frais (+ PLP)	µmoles NH_3/h foie total (+ PLP)
Rats mâles	A 8 j. (3)	70	3,6	9,5	810 ± 33	23,1 ± 0,9	83
	A + Eth. 8 j. (6)	60	1,9	9,9	1760 ± 142	52,2 ± 4,2	99
Rats femelles	A 8 j. (5)	80	3,6	11,9	1355 ± 26	48,4 ± 1,9	174
	A + Eth. 8 j. (6)	64	2,6	12,3	1905 ± 56	70,0 ± 2,1	182
Rats mâles	B 8 j. (3)	86	5,3	11,5	1065 ± 13	36,9 ± 0,5	195
	B + Eth. 8 j. (3)	57	4,5	9,5	2135 ± 68	60,8 ± 1,9	272
Rats femelles	B 12 j. (3)	69	4,7	12,3	575 ± 20	21,2 ± 0,75	95
	B + Eth. 8 j. (3)	52	4,3	12,2	1495 ± 16	54,6 ± 0,6	234

Dans cette expérience, le substrat est la DL-homosérine.

Même légende que dans *Tableau I ;* la quantité d'éthionine ajoutée dans chaque régime est précisée dans les « Techniques ».

TABLEAU XXIII : Influence d'une injection de L-éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie du rat

Régime et nombre d'animaux			Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais	
					- PLP	+ PLP
UAR-Elevage	Rats femelles	N * (11)	135	6,4	12,99 ± 0,95	28,47 ± 1,2
		Eth. (10)	144	5,0	20,72 ± 0,64	44,10 ± 1,97
	Rats mâles	N (6)	180	7,6		40,5 ± 1,1
		Eth. (6)	166	6,4		50,2 ± 1,0
18 % de caséine	Rats mâles	N (8)	122	6,3		16,05 ± 0,9
		Eth. (8)	122	5,3		25,4 ± 0,9

Même légende que dans *Tableau I.*

* N = rats normaux — Eth. = rats ayant reçu une injection d'éthionine (3,3 mmoles/kg d'animal).

Signalons que le poids des foies de tous les rats traités à l'éthionine, foies qui paraissent riches en graisses, a fortement diminué par rapport à celui des animaux normaux, mais que la quantité de protéines par ml de préparation enzymatique, c'est-à-dire par unité de poids de foie, est inchangée.

L'augmentation par le traitement à l'éthionine de l'activité de la cystathionase est très nette, quelle que soit la teneur en protéines du régime, mais elle se manifeste plus lentement lorsque les animaux rçoivent un régime riche en protéines (60 % de caséine). De plus, si l'on exprime les résultats en µmoles d'H_2S formé par *foie total,* nous n'observons plus d'accroissement du taux de l'enzyme dans ces derniers groupes d'animaux. Toutefois, rappelons que la quantité d'éthionine ajoutée dans le régime de ces animaux est proportionnellement inférieure à celle utilisée avec le régime à 18 % de caséine.

Des nombres du *Tableau XXIII,* il apparaît que, 4 heures après une seule injection de L-éthionine, l'activité de l'enzyme est fortement augmentée chez les animaux injectés par rapport aux animaux non traités. Cette augmentation est plus spectaculaire chez les rats femelles que chez les rats mâles.

L'éthionine, soit incorporée dans le régime, soit administrée par injection, provoque une augmentation de la cystathionase du foie de rat : l'influence de cette substance, dans le cas précis de cet enzyme, est toute différente de celle que l'on observe généralement sur d'autres enzymes.

A la suite de ces résultats, il nous a semblé particulièrement intéressant d'essayer de préciser par quels mécanismes l'éthionine agit sur la cystathionase. Tout d'abord, nous avons recherché comment était interprétée l'action de l'éthionine par les auteurs qui ont étudié l'effet de cette substance sur les tissus animaux et, plus particulièrement, sur les activités enzymatiques de ces tissus. Une revue générale récente a fait le point sur cette question [58].

L'éthionine a été synthétisée, en 1938, par Dyer [59], afin de rechercher si le remplacement du groupement méthyle de la méthionine par le groupement éthyle de l'éthionine dans un régime modifierait le rôle métabolique et nutritionnel de la méthionine : un régime additionné d'éthionine donné à des rats fait apparaître chez ces animaux un foie gras, entraîne une perte rapide de poids et une forte mortalité ; ces phénomènes disparaissent si de la méthionine est ajoutée au régime en même temps que l'éthionine. L'éthionine ne peut donc remplacer la méthionine, elle est au contraire considérée comme un antimétabolite. Plus tard, Simpson, Farber et Tarver [57] ont constaté que l'éthionine inhibe la synthèse protéique dans les tissu des animaux, ce qui a été confirmé depuis par de nombreux auteurs ; citons, par exemple, Lee et Williams [60] qui empêchent l' « induction » par le tryptophane de la tryptophane pyrrolase du foie de rats en surimposant à l'injection de tryptophane une injection d'éthionine, ou encore Freedland et Harper [17] qui inhibent l'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphatase du foie de rats sous l'effet d'un régime riche en protéines, par addition à ce régime d'éthionine. Signalons que, d'une manière générale, on admet que cette substance a une influence plus grande chez les rats femelles que chez les rats mâles [61, 62].

Le comportement de la cystathionase du foie de rats vis-à-vis de l'éthionine est donc totalement opposé à celui des enzymes étudiés par ces auteurs.

Nous avons donc cherché à préciser par quel mécanisme l'éthionine agit sur la cystathionase.

ACTION DE L'ETHIONINE « IN VITRO »

Nous avons d'abord contrôlé si, *in vitro*, l'éthionine provoque une modification de l'activité de la cystathionase. Pour ce faire, nous avons préparé un extrait enzymatique à partir d'un foie de rat normal et nous avons déterminé l'activité enzymatique de 1 ml de cette

préparation (*a*) d'une part, de 1 ml de cette préparation (*b*) incubée en présence d'éthionine à la concentration 10^{-3} M pendant une heure d'autre part. Nous constatons que les activités des deux préparations sont très sensiblement égales, ceci que les mesures soient faites en présence ou en absence de PLP ajouté *in vitro*.

	Prép. a		Prép. b	
	- PLP	+ PLP	- PLP	+ PLP
µmoles H_2S/heure/ ml enzyme	2,85	7,25	2,95	7,00

Nous avons aussi recherché si l'éthionine agit en supprimant un inhibiteur de la cystathionase présent dans le tissu hépatique normal ; aussi avons-nous déterminé l'activité enzymatique d'un mélange, à parties égales, d'un extrait enzymatique obtenu à partir du foie d'un rat normal et d'un extrait préparé à partir du foie d'un rat traité à l'éthionine (régime à 5 % de caséine additionné de 0,5 % de DL-éthionine). Nous observons que cette activité est celle que l'on peut attendre si elle reflète la somme des activités des deux préparations mesurées séparément, ceci que les mesures soient faites en absence ou en présence de PLP ajouté *in vitro*.

	µmoles H_2S/heure	
	- PLP	+ PLP
0,5 ml N	1,55	2,53
0,5 ml N + Eth.	4,55	8,10
0,5 ml N + Eth. 0,5 ml N	8,27	9,70

L'éthionine ne modifie donc pas, *in vitro*, la vitesse de désulfuration de l'enzyme ; d'autre part, son action ne peut s'expliquer par la suppression d'un inhibiteur de l'enzyme existant dans le foie normal.

EFFETS COMPARES DU JEUNE ET DE L'ETHIONINE

Nous avions remarqué que les animaux nourris avec un régime contenant de l'éthionine absorbaient une quantité de nourriture bien inférieure à celle des animaux normaux, surtout en fin de traitement : l'action de l'éthionine n'était peut-être que le reflet d'un jeûne partiel.

Nous avons donc étudié l'action du jeûne sur l'activité de la cystathionase et nous l'avons comparée à celle de l'éthionine. Deux lots de rats sont mis, l'un au jeûne (groupe I, ces animaux ne disposent que d'eau), l'autre au régime additionné d'éthionine (groupe II, régime à 18 % de caséine contenant 1,5 % de DL-éthionine); trois à six rats de chaque groupe sont sacrifiés le premier, le troisième, le quatrième et le cinquième jour. A ce moment, les deux groupes d'animaux sont replacés à un régime normal à 18 % de caséine, certains sont tués 48 heures plus tard et les autres cinq jours après. L'activité enzymatique est déterminée chez les animaux des différents groupes et les résultats obtenus sont portés sur la *figure 6*. Nous voyons que le jeûne entraîne lui aussi une augmentation de la vitesse de désulfuration et que son action, comme celle de l'éthionine, ne se manifeste qu'après deux ou trois jours de traitement ; mais l'influence du jeûne est maximum au quatrième jour, on constate ensuite une diminution de l'activité de l'enzyme. L'éthionine, par contre, continue à faire augmenter le niveau de l'enzyme même après cinq jours (dans d'autres expériences, nous avons vu que l'activité de l'enzyme est encore très élevée sept à huit jours après un traitement à l'éthionine).

Après la réalimentation des animaux ou le retour à un régime sans éthionine, on observe pendant plusieurs jours la persistance d'une activité élevée chez les seconds, activité qui décroît rapidement chez les premiers : cinq jours après le changement de régime, chez les rats du groupe I, l'activité de l'enzyme est pratiquement normale, tandis que, dans le groupe II, l'activité de l'enzyme est encore très élevée.

Nos résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par Goswami et coll. [33] qui observent que la désulfhydrase du foie de poulet est sensible au jeûne : son niveau est augmenté les premiers jours du jeûne, il diminue ensuite ; rappelons toutefois que Goswami et coll. utilisent un extrait enzymatique de foie total, alors que nous mesurons l'activité enzymatique de la fraction soluble.

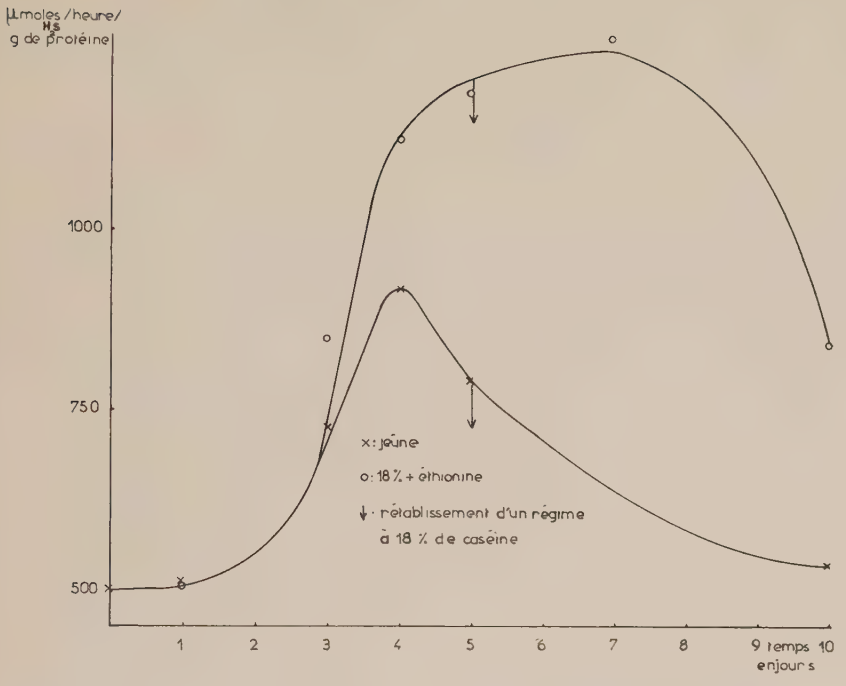

Fig. 6 : Effets comparés d'un jeûne prolongé et d'un régime additionné d'éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat

L'action du jeûne sur les tissus animaux a fait l'objet de nombreux travaux ; d'après Rosen et Nichol [63], le jeûne entraîne souvent des modifications du taux de certains enzymes, modifications qui se traduisent soit par une diminution, soit par une augmentation ; les enzymes dont le niveau est accru par ce traitement sont généralement liés au métabolisme des acides aminés, ce qui veut dire que les animaux vivent, au début, de leurs réserves (graisses, hydrates de carbone) puis, lorsque celles-ci s'épuisent, ils utilisent les acides aminés comme source d'énergie. La cystathionase ne ferait ainsi pas exception.

Le jeûne a donc une action évidente sur l'activité de la cystathionase du foie de rat, mais cette action est différente de celle de l'éthionine et, de toutes les façons, le jeûne ne pourrait pas rendre compte de l'augmentation de l'enzyme observée *quatre heures après une injection d'éthionine*. Il nous faut donc chercher une autre explication à l'influence de l'éthionine sur la cystathionase.

COMPORTEMENT DE L'ENZYME EXTRAIT DE FOIE DE RATS TRAITES A L'ETHIONINE

On pouvait envisager que l'enzyme extrait du foie de rats traités à l'éthionine a une structure primaire différente de celui extrait du foie de rats normaux et qu'en particulier il contiendrait de l'éthionine incorporée à la place de la méthionine. Or, nous disposions au laboratoire [3, 4] d'une méthode de purification de la cystathionase à partir du foie de rat, méthode qui permet d'obtenir une préparation homogène à l'ultracentrifugation. En collaboration avec LOISELET et CHATAGNER, nous avons effectué une purification de la cystathionase à partir de foies de rats (50 animaux pour chaque expérience) ayant reçu pendant une huitaine de jours un régime additionné d'éthionine, et nous avons observé que le comportement de cette dernière est, à tous les stades de la purification, extrêmement voisin de celui d'une préparation obtenue à partir de foies de rats non traités.

De plus, nous avons examiné l'effet d'une dénaturation thermique ménagée en fonction du temps sur deux extraits enzymatiques non purifiés, le premier (RN) étant préparé à partir d'un foie de rat normal, le second (REth) à partir d'un foie traité à l'éthionine ; nous avons aussi recherché si le PLP protège l'extrait REth contre la dénaturation thermique. Le protocole de l'expérience est décrit dans le chapitre « Techniques ». Les résultats, portés dans la *figure 7*, représentent les logarithmes de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps de traitement.

Nous constatons qu'après 45 minutes de traitement à 65°, les activités résiduelles des préparations RN et REth sont environ le 1/5^{e} des activités initiales respectives et que les pentes des courbes RN et REth sont très voisines. Ceci permet de penser que la majorité des molécules d'enzyme est identique dans les deux groupes d'animaux ; de plus, l'incubation en présence de PLP protège et l'enzyme du rat normal (RN + PLP), ainsi que nous l'avions déjà observé, et l'enzyme du rat éthionine (REth + PLP) contre la dénaturation thermique.

Enfin, la composition en acides aminés de quelques préparations enzymatiques purifiées, homogènes à l'ultracentrifugation, puis hydrolysées, a été déterminée au moyen d'un autoanalyseur Technicon. D'après les résultats obtenus jusqu'ici, il apparaît que l'enzyme extrait de foies de rats normaux (pour un poids moléculaire d'environ 190 000)

ne contient pas de résidu méthionine ; ainsi, l'hypothèse d'une incorporation de l'éthionine à la place de la méthionine ne peut être retenue.

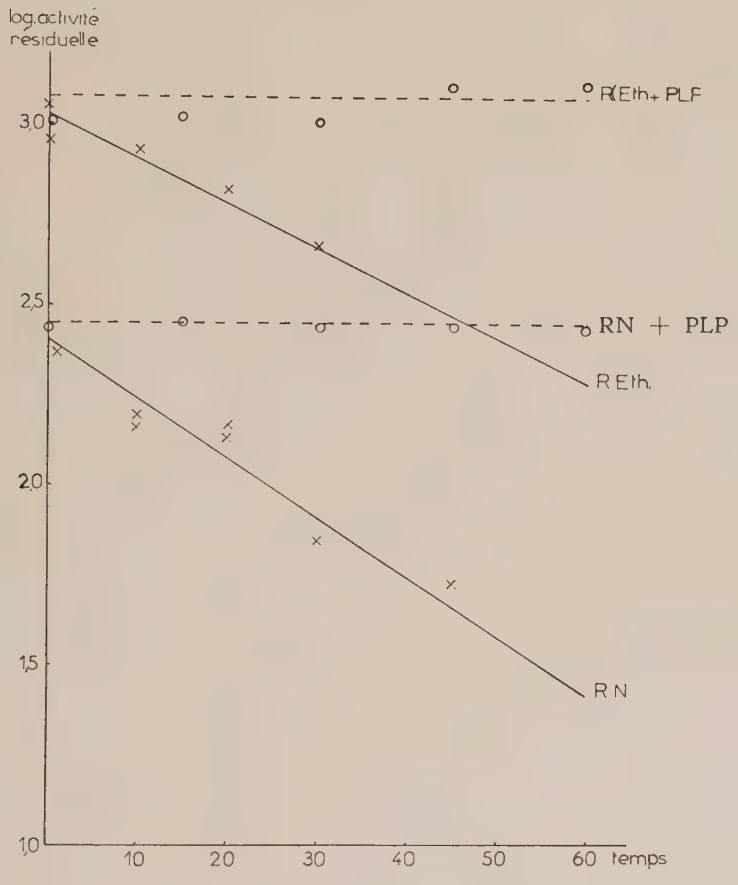

Fig. 7 : Dénaturation thermique de préparations de foies de rats normaux et de rats traités à l'éthionine

Ce fait, associé aux résultats obtenus lors des purifications et au cours des expériences de dénaturation thermique, permet de considérer que l'enzyme obtenu à partir de foies de rats traités à l'éthionine n'est pas différent de celui extrait de foies de rats normaux.

Rappelons que, dans nos conditions de mesure, une modification de l'activité de la cystathionase extraite du foie de rats soumis à un traitement déterminé (substrats, hormones) reflète une altération de la quantité d'apoenzyme dans le foie ; l'enzyme extrait de foie de rats ayant reçu de l'éthionine n'étant pas différent de celui obtenu à partir d'animaux normaux, l'augmentation de l'activité enzymatique observée après un traitement à l'éthionine est donc bien le reflet, lui aussi, d'un accroissement de la quantité d'apocystathionase.

INJECTION D'ETHIONINE A DES RATS SURRENALECTOMISES

On pouvait alors se demander si cette augmentation est le résultat d'un « stress » entraînant une production ou une sécrétion accrue d'hormones cortico-surrénaliennes ; en effet, nous avons vu, dans un précédent chapitre, que le niveau de la cystathionase du foie de rat mâle est augmentée après des injections d'hydrocortisone. Nous avons recherché si l'action de l'éthionine sur l'activité de la cystathionase nécessite la présence des glandes surrénales. Pour ce faire, nous avons injecté de la L-éthionine à des rats mâles et à des rats femelles surrénalectomisés et nous avons mesuré l'activité enzymatique de la cystathionase chez les différents groupes d'animaux. Les résultats sont présentés dans le *Tableau XXIV ;* dans nos conditions d'expériences (rats de l'élevage de Gif, souche Wistar WCF, soumis au régime « UAR-Elevage »), nous constatons que, chez les rats mâles, la surrénalectomie conduit, cinq à sept jours après l'ablation, à une activité enzymatique peu différente de celle des animaux intacts et qu'une injection d'éthionine entraîne une augmentation du niveau de l'enzyme aussi bien chez les rats normaux que chez les rats surrénalectomisés. L'action de l'éthionine est donc, dans ce cas, indépendante de la présence des glandes surrénales. Par contre, dans le foie des rats femelles, l'activité de l'enzyme reste la même chez les animaux normaux, chez les animaux surrénalectomisés et chez les animaux surrénalectomisés et injectés d'éthionine ; l'éthionine provoque un accroissement de l'activité de l'enzyme uniquement chez les rats qui possèdent leurs glandes surrénales ; son action, chez les rats femelles, est liée à la présence des glandes surrénales.

Rappelons qu'une différence de comportement, suivant le sexe de l'animal, a déjà été observée lorsque l'éthionine est utilisée comme inhibiteur de la synthèse protéique [61, 62] et que, selon NATORI, les hormones androgènes interviendraient dans certaines étapes du métabolisme de l'éthionine [62]. Nous reviendrons sur ces observations ultérieurement.

TABLEAU XXIV : Influence d'une injection de L-éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat surrénalectomisé

Modalités de l'expérience et nombre d'animaux			Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais	
					- PLP	+ PLP
Rats mâles	N *	(11)	126	5,9	10,56 ± 1,15	24,60 ± 1,2
	Eth.	(9)	129,5	5,5	15,70 ± 1,8	29,68 ± 1,58
	S	(12)	126	5,4	11,52 ± 0,88	27,65 ± 0,09
	S + Eth.	(11)	128	4,7	13,06 ± 0,6	34,88 ± 1,3
Rats femelles	N	(6)	135	6,4	13,38 ± 1,62	29,71 ± 1,62
	Eth.	(5)	154,5	5,8	21,41 ± 0,92	48,18 ± 1,8
	S	(6)	122	4,9	10,25 ± 0,6	26,75 ± 4,7
	S + Eth.	(5)	123	3,6	12,72 ± 1,35	27,70 ± 2,44

Même légende que dans *Tableau I.*

* N = rats normaux — Eth. = rats ayant reçu une injection d'éthionine (3,3 mmoles/kg d'animal) — S = rats surrénalectomisés — S + Eth. = rats surrénalectomisés ayant reçu une injection d'éthionine.

ACTION DE L'ETHIONINE PAR L'INTERMEDIAIRE DES SUBSTRATS

Nous avons envisagé une autre hypothèse pouvant rendre compte de l'effet de l'éthionine : une action de cette substance par l'intermédiaire des substrats de la cystathionase. En effet, STEKOL et coll. [64, 65] ont trouvé, dans les tissus animaux ayant reçu de l'éthionine marquée S^{35}, de la cystéine S^{35} ; chez les animaux, l'éthionine se dégrade donc probablement comme la méthionine [66], selon le schéma suivant :

Ethionine ⟶ S adénosylEth. ⟶ S adénosylHomocystéine ⟶
Homocystéine (+ sérine) ⟶ Cystathionine ⟶ Cystéine + acide α-cétobutyrique

Cette dégradation est cependant de faible importance [64].

L'augmentation de l'activité de la cystathionase observée chez les animaux ayant reçu de l'éthionine pourrait donc être due à une plus grande quantité de substrat dans le foie. A ce propos, des analyses des acides aminés libres du foie de rats normaux, du foie de rats traités à l'éthionine (soit par administration d'un régime additionné de DL-éthionine, soit par une injection de L-éthionine) et du foie de rats injectés de L-méthionine ont été faites [67] et la présence

d'homosérine dans le foie des animaux des deux derniers groupes a été décelée ; or, dans le schéma classique de la dégradation de la méthionine ou de l'éthionine, il n'y a jamais formation d'homosérine. Cependant MATSUO et GREENBERG [68] ont trouvé de l'homosérine marquée sur le carbone lors de l'analyse de tissus de souris ayant reçu des injections de DL-méthionine marquée, mais ils n'ont pu expliquer la formation de cette substance. Toutefois, ces auteurs traitaient à l'autoclave à 105° les corps des souris avant de les homogénéiser et on pouvait craindre que l'origine de l'homosérine soit chimique, car PARKS et SCHLENK [69] avaient observé que la S-adénosyl-méthionine chauffée à pH 4 pendant 20 minutes à 100° se dégradait en donnant un peu d'homosérine. Une objection analogue pouvait nous être faite car la méthode que nous utilisons [70] fait intervenir une déprotéinisation de 5 minutes au bain-marie bouillant. Cette objection a d'ailleurs été soulevée par SCHLENK [71], mais elle a pu être rejetée ; en effet, si les acides aminés libres du foie sont préparés par une autre méthode [72] qui consiste à déprotéiniser le milieu à froid par addition d'alcool, il a été observé [39] que l'on retrouve de l'homosérine lorsque les analyses sont faites sur des foies de rats traités à l'éthionine ou la méthionine.

L'hypothèse d'une action de l'éthionine sur l'activité de l'enzyme par formation d'un des substrats, à savoir l'homosérine, semble donc pouvoir être retenue. Ce point fera l'objet de recherches ultérieures.

Au cours de ces analyses d'acides aminés libres, la présence de cystathionine n'a jamais été mise en évidence ni dans le foie de rats normaux, ni dans celui de rats traités à l'éthionine. Nous avons cependant recherché dans quelle mesure l'éthionine provoquait une modification de l'activité de la cystathionine-synthétase ou sérine-déhydrase.

En effet, cet enzyme, présent dans la fraction soluble d'un homogénat de foie de rat, catalyse la formation de cystathionine (l'un des substrats de la cystathionase) à partir d'homocystéine et la désamination de la sérine et de la thréonine [27, 44, 73]. De plus, l'activité de cet enzyme est susceptible d'être modifiée par divers facteurs hormonaux et nutritionnels : des injections de cortisol à des rats provoquent une forte augmentation du taux de la sérine-déhydrase dans le foie de ces animaux [44]; l'administration d'un régime riche en protéines entraîne, lui aussi, un accroissement du taux de cet enzyme dans le foie [44, 74, 75]. Signalons qu'en ce qui concerne une action éventuelle du substrat sur l'activité de cet enzyme, les résultats obtenus jusqu'ici sont contradictoires : selon SAYRE et coll. [45], une injection de thréonine augmente l'activité de l'enzyme ; ce phénomène n'a pu être observé par GOLDSTEIN et coll. [44].

A ce propos, nous avons entrepris les expériences suivantes : des rats mâles sont soumis pendant quelques jours à un régime additionné de DL-éthionine et l'activité de la sérine-déhydrase est déterminée dans le foie de ces animaux. Des résultats présentés dans le *Tableau XXV*, il ressort qu'après huit jours d'un traitement à l'éthionine, l'activité de la sérine-déhydrase, déterminée en présence du coenzyme (PLP) ajouté *in vitro*, ce qui reflète la mesure de l'activité totale de l'apoenzyme, est fortement augmentée dans le foie (deux séries de déterminations ont été effectuées à deux jours d'intervalle).

Dans une autre expérience, nous avons comparé l'activité de la sérine-déhydrase extraite de foie de rats ayant reçu un régime contenant de l'éthionine à celle observée chez des animaux soumis à un jeûne prolongé. Les résultats sont présentés dans le *Tableau XXVI*. Nous voyons qu'un jeûne de cinq jours entraîne une augmentation fort importante de l'activité de l'enzyme. Ce dernier résultat est en accord avec celui obtenu par Freedland et Avery [74].

La sérine-déhydrase serait donc, peut-être, un autre enzyme dont l'activité est augmentée par l'éthionine. Signalons que cette hypothèse, qui fera l'objet de recherches ultérieures, est en désaccord avec des observations dues à Grillo et Fossa [76], selon lesquelles l'activité de la sérine-déhydrase serait diminuée chez le rat traité à l'éthionine. Nous avons signalé que, lors d'analyses d'acides aminés libres, la cystathionine n'a pas été décelée ni dans le foie de rats normaux, ni dans le foie de rats traités à l'éthionine ; parmi les substrats de la cystathionase, seule l'homosérine a pu être mise en évidence dans le foie de rats traités à l'éthionine.

D'après ces résultats, l'hypothèse selon laquelle l'éthionine agirait sur la cystathionase par l'intermédiaire de l'un des substrats de l'enzyme, à savoir l'homosérine, n'est pas à négliger.

ACTION DE L'ETHIONINE PAR L'INTERMEDIAIRE DU COFACTEUR

Une autre hypothèse peut être formulée concernant le mécanisme d'action de l'éthionine sur la cystathionase du foie de rat. En effet, si nous examinons les pourcentages de saturation et de stimulation par le PLP de l'apoenzyme, nous constatons qu'ils sont parfois modifiés par rapport aux animaux normaux chez les animaux recevant un *régime additionné d'éthionine* (*Tableau XXVII*, p. 72) : le pour-

TABLEAU XXV : Influence d'un régime additionné de DL-éthionine sur l'activité de la sérine déhydrase du foie de rat mâle

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles pyruvate/heure/ g de foie frais + PLP
RN * (4)	136	8,2	11,55 ± 0,63
R Eth. 8 j. (3)	99	3,7	27,15 ± 0,48 [a]
(3)	98	4,1	21,45 ± 0,45 [b]

Même légende que dans *Tableau I.*

* RN = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine — R Eth. = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine contenant 2 % de DL-éthionine — *a, b* = les dosages ont été effectués sur 2 lots d'animaux à 2 jours d'intervalle.

TABLEAU XXVI : Effets comparés d'un jeûne prolongé et d'un régime additionné de DL-éthionine sur l'activité de la sérine déhydrase du foie de rat mâle

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles pyruvate/heure/g de foie frais + PLP
RN * (3)	160	8,0	16,5 ± 1
R Eth. 5 jours (3)	137	5,1	24,45 ± 0,75
RJ 5 jours (3)	142	4,5	33,90 ± 1,95

Même légende que dans *Tableau I.*

* RN = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine — R Eth. = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine contenant 2 % de DL-éthionine — RJ = rats soumis à un jeûne total.

centage de saturation de l'apoenzyme en coenzyme est beaucoup plus élevé dans le premier cas, le pourcentage de stimulation est, de ce fait, plus faible.

Nous avons tout d'abord contrôlé que cette diminution du pourcentage de stimulation par le PLP. chez les animaux ayant reçu un régime additionné d'éthionine, n'est pas le reflet d'une insuffisance de la quantité de PLP ajouté *in vitro* par rapport à la protéine enzymatique qui existe en concentration importante dans le foie de ces animaux. Nous avons pour cela mesuré la vitesse de désulfuration d'une préparation de foie de rat traité à l'éthionine (régime à 18 % de caséine contenant 2 % de DL-éthionine) en présence de quantités variables de PLP ajouté *in vitro* et en particulier en présence d'une quantité (1 000 μg) supérieure à celle utilisée dans les conditions habituelles de dosage (100 μg). Les résultats sont présentés ci-après :

	Quantité de PLP ajouté in vitro					
	0	10	20	50	100	1000
μmoles H_2S/ heure/g foie frais	15,05	26	29,5	31,5	33	35

Il ressort de l'examen de ces chiffres, que la production d'H_2S, déterminée en présence de 1 mg de PLP ajouté *in vitro*, est peu différente de celle mesurée dans les conditions habituelles ; dans ces dernières, même pour des préparations de foie de rats traités à l'éthionine, le PLP n'est pas facteur limitant : la production d'H_2S observée dans les préparations de foies rend donc compte de la teneur en apoenzyme total du foie.

Puisque le pourcentage de saturation en PLP est souvent plus élevé dans les préparations de foie de rats traités à l'éthionine, on pourrait en conclure que, apparemment, ces animaux disposent d'une plus grande quantité de PLP dans le foie. Cependant, au laboratoire, des dosages de PLP ont été effectués sur des homogénats de foies de rats normaux et de rats traités à l'éthionine et il est apparu que la quantité de PLP par g de foie est sensiblement la même pour les deux groupes d'animaux [39].

Cette augmentation du pourcentage de saturation de l'apoenzyme en coenzyme ne serait pas due à la présence de quantité plus grande de PLP dans le foie, mais plutôt à une disponibilité plus importante

du PLP pour la cystathionase chez les rats traités à l'éthionine, disponibilité entraînée peut-être par la forte diminution de concentration d'autres enzymes à PLP, telle la décarboxylase de l'acide cystéine sulfinique [77]. Soulignons que, jusqu'ici, les dosage de PLP ont été effectués sur des homogénats non fractionnés de foies et qu'une non-modification du taux en PLP dans les homogénats ne signifie pas qu'il n'y ait pas eu altération de la quantité de PLP dans la fraction non particulaire. Il pourrait en effet y avoir passage du PLP des fractions particulaires vers la fraction soluble, phénomène qui augmenterait la teneur en PLP de la fraction non particulaire sans modifier la quantité en PLP de l'homogénat total. Cette hypothèse est suggérée par les travaux de FEIGELSON et GREENGARD [78] qui ont montré que l'augmentation de l'activité de la tryptophane pyrrolase (enzyme présent dans la fraction soluble) dans le foie de rats ayant reçu une injection de tryptophane est en fait due à une « délocation » du coenzyme (hématine) des fractions particulaires vers la fraction soluble.

Une augmentation de l'activité de la cystathionase chez les rats traités à l'éthionine, due à un accroissement de la disponibilité du coenzyme, n'est pas à exclure et mérite d'être étudiée de manière plus approfondie ultérieurement.

D'autre part, il nous a paru intéressant d'examiner si une carence en pyridoxine a une répercussion sur l'influence de l'éthionine. Nous avons donc comparé le niveau de la cystathionase chez des animaux soumis à un régime dépourvu de pyridoxine et additionné de DL-éthionine, à celui déterminé chez des animaux carencés en vitamine B_6.

L'expérience est réalisée de la façon suivante : un lot de rats mâles est placé à un régime synthétique à 18 % de caséine (B) pendant environ une semaine. Les animaux sont ensuite répartis en quatre groupes : le premier continue à recevoir le régime B pendant 2 semaines, le deuxième est soumis au régime B dépourvu de pyridoxine pendant 3 semaines environ ; les animaux du troisième groupe sont maintenus au régime B complet encore une semaine, puis placés pendant une semaine à un régime B additionné de 2 % de DL-éthionine. Dans le quatrième groupe, les animaux reçoivent un régime B dépourvu de pyridoxine et, 8 jours avant le sacrifice, leur régime est additionné de 2 % de DL-éthionine. Il ressort des nombres présentés dans le *Tableau XXVII* que l'activité de la cystathionase est nettement augmentée chez les animaux ayant reçu un régime contenant de l'éthionine, que ce régime soit complet ou dépourvu de vitamine B_6.

La carence de pyridoxine ne modifie pas l'ampleur de l'action de l'éthionine.

INJECTION D'ETHIONINE A DES RATS INJECTES A LA PUROMYCINE OU A LA THYROXINE

Nous avons vu, dans un précédent chapitre, que SCHIMKE et coll. [56] proposaient, pour expliquer l' « induction » par divers facteurs hormonaux et nutritionnels de la tryptophane-pyrrolase du foie de rat, une action des hormones cortico-surrénaliennes sur la vitesse de synthèse de cet enzyme, une action des substrats et cofacteurs sur sa vitesse de dégradation. Ayant constaté que, dans une certaine mesure, ces hypothèses pouvaient s'appliquer à la cystathionase du foie de rat, nous avons recherché si l'éthionine agit sur la vitesse de synthèse de la cystathionase. Nous avons donc injecté de la L-éthionine à des rats mâles et femelles ayant reçu plusieurs injections, soit de 8-azaguanine, soit de puromycine, et comparé le niveau de l'enzyme dans le foie de ces animaux à celui déterminé chez des animaux normaux ou ayant reçu une injection de L-éthionine. Les résultats sont présentés dans le *Tableau XXVIII*. Trois séries d'expériences ont été réalisées. Dans la première, la durée qui sépare la première injection de l'inhibiteur de synthèse protéique du sacrifice des animaux est assez courte (24 h pour la 8-azaguanine, 4 heures pour la puromycine) : l'activité de l'enzyme est sensiblement la même chez les animaux injectés d'éthionine et de puromycine et injectés d'éthionine et de 8-azaguanine, c'est-à-dire demeure beaucoup plus élevée que celle mesurée chez les animaux normaux.

Dans les deuxième et troisième expériences, les injections sont faites pendant plusieurs jours et, dans le cas de la 8-azaguanine, les doses injectées sont plus élevées ; l'activité enzymatique mesurée chez les animaux traités à l'éthionine et, soit à la 8-azaguanine, soit à la puromycine, est plus élevée que celle déterminée chez les animaux normaux, mais toutefois plus faible que chez les animaux traités à l'éthionine seule : l'action de l'éthionine est inhibée légèrement par la 8-azaguanine, et diminuée de 50 % par la puromycine. Signalons que la puromycine comme la 8-azaguanine n'ont pas d'action sur le niveau de l'enzyme des animaux normaux.

L'influence de l'éthionine sur la cystathionase est donc partiellement diminuée par des inhibiteurs de la synthèse protéique, ce qui signifierait que l'éthionine agit, en partie au moins, sur la vitesse de synthèse de l'enzyme.

TABLEAU XXVII : Action simultanée d'une carence en pyridoxine et d'un régime additionné de DL-éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat mâle

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	Poids des animaux (g)	Poids des foies (g)	µmoles H_2S/heure/g foie frais		% saturation en coenzyme	% stimulation par le coenzyme
			- PLP	+ PLP		
18 % (4)	91	6,2	6,3 ± 0,3	12 ± 0,3	52,5	91
18 % - B_6 (5)	118	5,2	2,75 ± 0,15	8,5 ± 0,5	32,5	210
18 % + Eth. (6)	73	3,2	27 ± 1,7	33,15 ± 2,7	81,5	22,7
18 % - B_6 + Eth. (3)	84	3,2	29,15 ± 2,3	40,4 ± 2,2	72	38,6

Même légende que dans *Tableau I.*

18 % = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine — 18 % - B_6 = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine dépourvu de pyridoxine — 18 % + Eth. = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine additionné d'éthionine (2 %) — 18 % - B_6 + Eth. = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine dépourvu de pyridoxine, additionné d'éthionine (2 %).

TABLEAU XXVIII : Influence d'une injection de L-éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rat traité à la puromycine ou à la 8-azaguanine

Traitements imposés aux animaux et nombre d'animaux		µmoles H_2S/heure/g foie frais (+ PLP)
Régime 18 % caséine (rats mâles)	(3) RN	16 ± 0,8
	(3) R Eth.*	25,2 ± 0,9
	(4) R Eth.* + Pu. (5 mg 4 fois en 4 heures)	23,95 ± 3,5
	(3) R Eth.* + Aza. (7,5 mg 3 fois en 24 heures)	26,5 ± 1,7
Régime UAR-Elevage (rats mâles)	(3) RN	27,60 ± 1,1
	(4) R Eth.*	40,8 ± 1,4
	(4) R Aza. (20 mg 2 fois par jour pendant 3 jours)	30,7 ± 0,65
	(9) R Eth.* + Aza. (20 mg 2 fois en 24 heures)	37,1 ± 0,95
	(4) R Eth.* + Aza. (7,5 mg 2 fois par jour pendant 3 jours)	36,9 ± 1,3
Régime UAR-Elevage (rats femelles)	(5) RN	42,0 ± 2,5
	(5) R Eth.*	51,2 ± 1,15
	(5) R Pu. (5 mg 1 fois par jour pendant 4 jours)	40,7 ± 3,15
	(5) R Eth.* + Pu. (5 mg 1 fois par jour pendant 4 jours)	46,5 ± 1,25

Même légende que dans *Tableau I.*

RN = rats normaux de souche Wistar WCF — R Eth. = rats ayant reçu une injection d'éthionine — R Pu. = rats ayant reçu des injections de puromycine — R Aza. = rats ayant reçu des injections de 8-azaguanine — R Eth. + Pu. = rats ayant reçu des injections d'éthionine et de puromycine — R Eth. + Aza. = rats ayant reçu des injections d'éthionine et de 8-azaguanine.

* Ces animaux reçoivent, 4 heures avant d'être sacrifiés, une injection de 3,3 mmoles de L-éthionine par kg d'animal.

Les résultats d'une expérience que nous allons décrire maintenant ne sont pas en désaccord avec cette manière de voir. Dans la mesure où l'éthionine agirait seulement en diminuant la vitesse de dégradation de l'apoenzyme, que ce phénomène soit dû à la présence d'homosérine ou à la disponibilité plus grande en coenzyme, l'effet de l'éthionine devrait être simplement diminué chez des animaux thyrotoxiques. Nous avons donc mesuré le niveau d'activité de la désulfurase soluble dans le foie d'animaux (groupe *c*) recevant chaque jour, pendant 8 jours, une injection de 500 μg de DL-thyroxine et soumis à un régime à 18 % de caséine contenant 2 % de DL-éthionine, et nous avons comparé ce niveau à celui observé dans le foie de rats (groupe *b*) rendus thyrotoxiques et recevant un régime à 18 % de caséine (régime B); à titre de contrôle, le niveau de désulfuration est aussi déterminé chez des animaux non traités recevant le régime B (groupe *a*).

Des résultats groupés dans le *Tableau XXIX*, il ressort que l'activité endogène et l'activité totale de la cystathionase chez les animaux du groupe *c* est très supérieure à celles des animaux du groupe *b*. L'effet de l'éthionine n'est donc pas supprimé par la thyroxicose ; ce qui conduit à penser que, chez les animaux du groupe *c*, la vitesse de synthèse de l'apoenzyme demeure élevée et que, par suite, l'éthionine doit agir au niveau de cette synthèse. Toutefois, chez les animaux du groupe *c*, le taux d'enzyme est inférieur à celui déterminé chez des animaux non thyrotoxiques et recevant de l'éthionine (voir *Tableau XXVII*, p. 72); mais si l'on calcule l'augmentation d'activité totale provoquée par l'éthionine chez les animaux normaux, et que l'on compare le chiffre obtenu à celui que l'on peut calculer chez les animaux thyrotoxiques recevant de l'éthionine, on constate que dans le premier cas on arrive à 175 % :

$$\frac{(33 - 12\ \% = 175\ \%)}{12}$$

alors que dans le deuxième on obtient 380 % :

$$\frac{(24 - 5\ \% = 380\ \%)}{5}$$

ce qui est encore en faveur d'une augmentation de la vitesse de synthèse de l'apocystathionase par l'éthionine, même chez les rats thyrotoxiques.

L'action de l'éthionine sur l'activité de la cystathionase du foie de rat est donc toute particulière : cette substance augmente l'activité de cet enzyme. Jusqu'ici, l'éthionine s'était comportée comme un

TABLEAU XXIX : Influence de l'éthionine sur l'activité de la désulfurase soluble du foie de rats thyrotoxiques

Traitement imposé aux animaux et nombre d'animaux	µmoles H_2S/heure/g foie frais		% saturation en coenzyme	% stimulation par le coenzyme
	- PLP	+ PLP		
Groupe a : RN (6)	6,32 ± 0,48	13,4 ± 0,54	47,5	112
Groupe b : R Th. (5)	2,25 ± 0,5	5,4 ± 0,43	43,5	131
Groupe c : R Th. + Eth. (5)	11,85 ± 0,83	24,4 ± 1,63	49,5	106

Même légende que dans *Tableau I.*

RN = rats ayant reçu un régime à 18 % de caséine — R Th. = rats soumis au régime à 18 % de caséine et ayant reçu pendant 8 jours une injection de thyroxine (500 µg/jour) — R Th. + Eth. = rats soumis au régime à 18 % de caséine additionné de 2 % de DL-éthionine et ayant reçu pendant 8 jours une injection de thyroxine.

inhibiteur de la synthèse protéique et, plus particulièrement, comme un inhibiteur de l' « induction » de divers enzymes par des facteurs hormonaux ou nutritionnels [58] : avant nos observations [79], il n'avait jamais été signalé d'augmentation du niveau d'un enzyme sous l'influence de l'éthionine. Tout récemment, cependant, HSIEN-GIEH-SIE et HABLANIAN [80] ont observé, sans toutefois expliquer ce phénomène, que la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, enzyme présent dans la fraction non particulaire du foie et nécessitant le NADP comme coenzyme, est accrue chez des animaux traités par l'éthionine.

Le mécanisme d'action de l'éthionine sur la cystathionase est encore mal défini ; il semblerait cependant que cette substance puisse agir de plusieurs manières : par l'intermédiaire de la formation de l'un des substrats de l'enzyme (homosérine), par modification de la vitesse de synthèse de l'enzyme, enfin peut-être par une « délocation » du PLP de la fraction particulaire, ce qui augmenterait le taux en PLP de la fraction soluble. Nous avons aussi constaté que, chez les animaux surrénalectomisés, l'influence de l'éthionine sur l'activité de la cystathionase est différence suivant le sexe de l'animal : l'action de l'éthionine n'a plus lieu chez les rats femelles surrénalectomisés, tandis qu'elle se manifeste encore chez les rats mâles privés de leurs glandes surrénales. Nous n'avons pas, jusqu'ici, d'explication de ce phénomène.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait apparaître de manière très nette que le niveau de la cystathionase ou cystéine désulfurase « soluble » du foie de rat est sensible à divers facteurs nutritionnels et que l'activité de cet enzyme peut également être modifiée par un certain nombre de facteurs hormonaux.

Nous avons, en effet, observé que, selon le régime alimentaire commercial auquel sont soumis les animaux, les taux d'enzyme mesurés dans le foie de ceux-ci sont fort différents. De plus, après passage d'un régime à un autre, la cystathionase « s'adapte » d'une manière relativement rapide selon la nature du régime. D'une manière plus précise, nous avons constaté au moyen de régimes synthétiques définis que la teneur en protéines du régime a une influence importante pour le niveau de l'enzyme : en particulier, un régime riche en protéines entraîne l'établissement d'un taux élevé de cystathionase dans le foie. Cependant, la différence des teneurs en protéines de ces régimes ne peut rendre compte à elle seule des variations du taux de cet enzyme.

Nous avons aussi observé que l'addition de méthionine ou de cystéine à un régime pauvre en protéines est favorable à l'établissement d'un taux d'enzyme plus élevé que celui déterminé chez les animaux ayant reçu un régime non enrichi en acides aminés soufrés, ce taux d'enzyme est toutefois inférieur à celui mesuré dans le foie d'animaux soumis à un régime riche en protéines. La faible teneur en acides aminés soufrés de la caséine n'est, elle aussi, responsable qu'en partie des variations de l'activité de la cystathionase.

Les expériences sur l'influence des régimes alimentaires commerciaux sur le taux de la cystathionase dans le foie ont été faites dans un double but : d'une part, afin de déterminer les conditions les plus favorables à l'établissement d'un taux élevé d'enzyme, ceci en vue de la purification de la cystathionase, d'autre part, afin de rechercher un protocole expérimental permettant l'établissement d'un taux cons-

tant d'enzyme ; en effet, toute recherche d'une modification de l'activité de l'enzyme sous l'influence d'un traitement donné était vaine tant que nous ne disposions pas d'un élément de référence sûr. Il s'agissait donc essentiellement d'expériences préliminaires, mais fort nécessaires pour des recherches ultérieures.

Les résultats que nous avons obtenus au moyen des régimes synthétiques dont la teneur en protéines est définie peuvent être rapprochés des observations faites par SCHIMKE [34] sur les enzymes du cycle de l'urée dans le foie du rat, observations que nous avons déjà signalées et d'après lesquelles il existe une relation proportionnelle entre la teneur du foie en ces enzymes et la teneur du régime en protéines ; d'après lesquelles aussi l'administration aux animaux d'un régime dont la teneur en protéines est différente de celle présente dans le régime fourni précédemment provoque, en quelques jours, des altérations des teneurs en enzymes.

Nous avons aussi étudié les modifications de l'activité de la cystathionase du foie de rat sous l'effet des hormones cortico-surrénaliennes et des hormones thyroïdiennes. Ainsi, des injections d'hydrocortisone provoquent une diminution du niveau de la cystathionase « activable » dans le foie des rats femelles, une augmentation de ce niveau dans celui des rats mâles. Comme nous l'avons indiqué au début du chapitre sur « L'influence des hormones et substrats », l'activité de nombreux autres enzymes est modifiée par une ou plusieurs injections de cortisol ou d'hydrocortisone : ainsi les niveaux de la tryptophane pyrrolase (TPO) et de la transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique (TCT) du foie de rat sont très fortement augmentés 4 heures après une seule injection de cortisol, alors que celui de la cystathionase du foie de rat mâle comme ceux de la sérine-déhydrase et de la transaminase alanine-acide α-cétoglutarique ne sont accrus qu'après plusieurs jours de ce traitement. L'action des hormones cortico-surrénaliennes se manifeste donc de manière plus ou moins rapide, ce qui pourrait être dû à une différence entre les vitesses de renouvellement des enzymes ; nous avons signalé, en faveur de cette théorie, que la TCT et la TPO ont des vitesses de renouvellement élevées. Nous n'avons pas d'explication concernant la différence d'action de l'hydrocortisone sur l'activité de la cystathionase selon le sexe de l'animal ; un tel phénomène n'est pas indiqué de manière particulière par les auteurs qui ont étudié l'effet des hormones cortico-surrénaliennes sur différents enzymes, nous n'avons donc pas de point de comparaison possible.

La répercussion de l'ablation des glandes surrénales dépend essentiellement du régime auquel sont soumis les animaux : en général, la surrénalectomie, pratiquée sur des animaux ayant reçu un régime

qui donne un niveau de désulfuration faible, entraîne un accroissement de ce niveau ; par contre, si les animaux sont soumis à un régime qui provoque un niveau de désulfuration élevé, l'ablation des glandes surrénales ne modifie pas ce niveau ou a tendance à le diminuer. Ces constatations ne sont valables que dans le cas des rats mâles, en effet, chez les rats femelles, nous n'observons pas de modifications de la cystathionase du foie quelles que soient les conditions de régime adoptées. On connaît d'autres exemples d'enzymes dont le comportement, sous l'influence de la surrénalectomie, dépend du régime auquel sont soumis les animaux. C'est le cas en particulier des enzymes du cycle de l'urée (ornithine transcarbamylase, arginosuccinate synthétase...) : la surrénalectomie entraîne une diminution de l'activité de ces enzymes, diminution plus importante chez des animaux ayant reçu un régime contenant 30 % de caséine que chez des animaux nourris avec un régime à 15 % de caséine [48].

L'influence des hormones thyroïdiennes est particulièrement nette : l'activité de la cystathionase est fortement augmentée dans le foie de rats thyroïdectomisés et elle est diminuée dans celui de rats thyrotoxiques. Ces hormones provoquent, de plus, des modifications du taux de phosphate de pyridoxal dans le foie, modifications qui vont dans le même sens que celles de l'activité de la cystathionase mais qui ne peuvent cependant pas rendre compte de la régulation de ces enzymes par ces hormones. Les hormones thyroïdiennes auraient une double action : et sur le coenzyme et sur l'apoenzyme de la cystathionase [50, 51, 52]. De nombreux autres enzymes ont leur activité modifiée par les hormones thyroïdiennes. Dans beaucoup de cas, on a seulement étudié soit l'influence d'injections de thyroxine, soit l'effet de la thyroïdectomie ; dans une revue relativement récente, Hoch [81] a regroupé les phénomènes établis. Pour nous limiter aux enzymes déjà cités à plusieurs reprises, il a été observé que l'activité de la TPO n'est pas modifiée par la thyroïdectomie, que celles de la TCT et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase sont augmentées par thyrotoxicose, diminuées par thyroïdectomie [82, 83]. L'effet des hormones thyroïdiennes sur ces enzymes est donc différent de celui observé sur la cystathionase.

Un autre résultat obtenu au cours de ce travail concerne l'action du cofacteur de l'enzyme sur son activité. Nous avons constaté que, dans tous les cas, l'activité de l'enzyme est nettement augmentée par addition de PLP *in vitro* (le pourcentage de saturation en coenzyme de l'apocystathionase dans le foie est voisin de 50 % chez les rats normaux) et que le phénomène est dû à une non-saturation de l'apoenzyme en coenzyme dans le foie, plutôt qu'à une dissociation du coenzyme de l'enzyme au cours de la préparation de l'extrait enzy-

matique. A propos de cette propriété de la cystathionase, on peut souligner que les TPO et TCT, enzymes dont nous avons souvent comparé les comportements à celui de la cystathionase, ne sont pas non plus saturées en coenzyme : l'addition *in vitro* d'hématine à des préparations de TPO [78], ou de PLP à des préparations de TCT augmente fortement l'activité de ces enzymes [37].

Une carence en vitamine B_6, qui a pour effet de diminuer la quantité de PLP disponible dans le foie, provoque une diminution de l'activité endogène de la cystathionase ; en début de traitement, l'activité totale n'est pas modifiée (l'addition de PLP *in vitro* restaure une vitesse normale de désulfuration), mais, si l'on prolonge la carence en pyridoxine, cette activité diminue : la réactivation par le PLP n'est plus que partielle, bien qu'elle soit très élevée par rapport à celle observée chez les animaux normaux. Ceci permet de penser que la diminution de l'activité endogène observée chez les rats carencés est provoquée seulement par la diminution de la quantité de PLP disponible dans le foie et non par une modification de la vitesse de synthèse de l'apoenzyme : une carence en pyridoxine ne supprimerait pas la synthèse de l'apocystathionase. Une conclusion analogue a été proposée par Lin et coll. [84] qui ont observé que l'activité endogène de la TCT est diminuée par une carence en vitamine B_6. L'addition *in vitro* de PLP restaure une activité voisine de celle présente chez les animaux normaux ; de plus, chez ces animaux carencés, une injection d'hydrocortisone augmente fortement l'activité de l'apotransaminase : une carence prolongée en pyridoxine ne modifie donc pas l' « induction » de l'apoenzyme « activable » par les hormones cortico-surrénaliennes.

Des expériences de dénaturation thermique d'extraits de foie de rats ont fait apparaître le rôle protecteur extrêmement net du PLP ; des observations analogues concernant ce rôle protecteur du PLP ont été faites au cours de purifications de cet enzyme [3, 4] et ces constatations portent à croire que, en présence de PLP, la vitesse de dégradation de l'enzyme serait diminuée. Les résultats obtenus à la suite d'injections de pyridoxine ne sont pas en désaccord avec cette manière de voir : l'activité endogène de la cystathionase est augmentée dans le foie d'animaux ayant reçu des doses massives de pyridoxine et sacrifiés quelques heures après ce traitement, l'activité endogène et l'activité totale de l'enzyme sont augmentées chez les animaux traités pendant plusieurs jours par des doses faibles de pyridoxine. Ces injections accroissent très probablement le taux en PLP du foie. Des expériences antérieures [21] avaient permis d'établir que l'activité d'autres enzymes à phosphate de pyridoxal, les décarboxylases de l'acide cystéine-sulfinique et de la Dopa sont aug-

mentées par des injections de pyridoxine : le taux de la TCT est, lui aussi, accru à la suite d'injections de doses massives de pyridoxine [37].

Une autre observation intéressante a été faite au cours de ce travail ; l'injection d'un substrat (homosérine) ou d'un précurseur de substrats (méthionine) de la cystathionase augmente l'activité de l'enzyme dans le foie du rat mâle. Par contre, cette augmentation n'a pu être mise en évidence ni dans le foie de rats femelles injectés d'homosérine, ni dans celui de rats femelles ovariectomisées et injectées d'homosérine. Cette action du substrat, chez les rats mâles, semble spécifique puisque d'autres acides aminés tels que l'alanine ou le tryptophane ne provoquent pas de telles modifications. Nous avons déjà signalé que l'activité d'autres enzymes (TPO, TCT) est accrue chez les animaux ayant reçu une injection de substrat, sans qu'il soit précisé si une différence est observée selon le sexe de l'animal. Nous avons également observé que chez le rat mâle surrénalectomisé, une injection d'homosérine n'entraîne plus d'augmentation de l'activité de la cystathionase : l'action de l'homosérine est donc liée à la présence des glandes surrénales. Un tel phénomène a lieu aussi pour la TCT du foie du rat qui n'est plus « induite » par le substrat chez le rat surrénalectomisé ; en revanche, le tryptophane provoque une augmentation de la TPO aussi bien chez le rat normal que chez le rat surrénalectomisé.

Nous pouvons conclure de ces diverses observations que la cystathionase du foie de rat se comporte comme un enzyme « adaptatif », c'est-à-dire que son niveau enzymatique est modifié par divers traitements imposés aux animaux. Ces modifications sont, généralement, assimilées à des altérations de la synthèse de la protéine enzymatique ; nous avons recherché s'il en était bien ainsi pour la cystathionase du foie de rat.

D'après les résultats que nous avons obtenus lors de traitements des animaux par la 8-azaguanine ou le 5-fluorouracile, deux inhibiteurs de la synthèse protéique, les augmentations de l'activité de la cystathionase chez les rats mâles ayant reçu des injections de substrat (homosérine) seraient dues à une accumulation de l'enzyme dans le foie de ceux-ci, reflétant probablement une augmentation de la vitesse de synthèse de l'enzyme.

Schimke et coll. [56] ont proposé, récemment, d'interpréter les modifications de l'activité de la TPO du foie de rat sous l'influence de divers facteurs de la manière suivante : les hormones cortico-surrénaliennes agiraient au niveau de la vitesse de synthèse de l'enzyme, les cofacteurs et les substrats au niveau de sa vitesse de dégradation. Ces propositions sont en accord avec les résultats obtenus

par KENNEY [49] : cet auteur a constaté que chez des rats ayant reçu des injections d'hydrocortisone et de leucine radioactive, le niveau de la TCT du foie est augmenté et que la vitesse de synthèse de la TCT est accrue par l'hydrocortisone. Les hypothèses de SCHIMKE et coll. peuvent s'appliquer, en partie, à la cystathionase du foie de rat. En effet, des injections de puromycine, inhibiteur de la synthèse protéique, à des rats thyroïdectomisés diminuent fortement l'effet de la thyroïdectomie. Ce résultat est en faveur d'une modification de la vitesse de synthèse de l'apocystathionase sous l'influence des hormones thyroïdiennes : chez des rats thyroïdectomisés, il y aurait accroissement de cette vitesse de synthèse, alors que chez les rats thyrotoxiques, il y aurait diminution de cette vitesse. Par contre, le coenzyme, comme nous venons de le voir, agirait sur la vitesse de dégradation de l'apoenzyme. En ce qui concerne l'action des substrats, on pouvait penser qu'ils agissent en diminuant la vitesse de dégradation de l'apocystathionase, mais ceci n'est pas en accord avec le fait que l'influence de l'homosérine ne se manifeste plus d'une part chez les animaux surrénalectomisés, d'autre part chez les animaux dont la synthèse protéique est perturbée par des antimétabolites. L'effet du substrat sur l'activité de la TCT nécessite aussi la présence des glandes surrénales : les propositions de SCHIMKE et coll. concernant l'effet des substrats ne peuvent donc être retenues dans ces deux derniers cas.

Certains des résultats qui viennent d'être rapidement résumés sont très nets, mais, d'après les observations que nous avons faites jusqu'ici, il n'est pas possible d'expliquer de manière précise par quels mécanismes la régulation de l'activité de la cystathionase sous l'influence de facteurs hormonaux ou nutritionnels est effectuée. Toutefois, nous avons envisagé diverses hypothèses qui orientent de nouvelles recherches. En effet, les problèmes essentiels qui se posent sont les suivants : la vitesse de synthèse de l'apocystathionase est-elle susceptible de varier selon les conditions de traitement auxquelles sont soumis les animaux ? D'autre part, la vitesse de dégradation de cette même protéine est-elle modifiée par certains de ces traitements ? Pour essayer d'apporter quelques réponses à ces questions, il semble préférable de se placer, en premier lieu, dans les cas où les altérations de l'activité enzymatique sont particulièrement nettes, cas par exemple de la thyroïdectomie et des injections d'hydrocortisone.

Nous avons déjà rappelé que, sous l'effet de la thyroïdectomie, l'augmentation de l'activité de la cystathionase est probablement due à une augmentation de la vitesse de synthèse de l'apoenzyme puisque cet effet est, en partie, supprimé par la puromycine ; il sera évidemment fort intéressant de déterminer dans quelle mesure l'actinomycine

peut avoir une influence sur l'action de la thyroïdectomie. Des expériences parallèles, faisant intervenir soit la puromycine, soit l'actinomycine, pourront être entreprises chez des rats recevant des injections d'hydrocortisone.

Il serait, cependant, quelque peu illusoire de penser que ces expériences apporteront des résultats définitifs, surtout devant le nombre croissant d'observations d'après lesquelles ces inhibiteurs de synthèse protéique présentent, lorsqu'ils sont employés chez les animaux, des comportements fort complexes et « paradoxaux » [85, 86, 87].

En effet, il a été observé que si des doses élevées d'actinomycine inhibent l'augmentation par le cortisol de l'activité de la TPO et la TCT, cette substance injectée à des doses faibles provoque un accroissement plus ou moins rapide des niveaux de ces deux enzymes, de la transaminase alanine-acide α-cétoglutarique et surtout de la sérine déhydrase [85]; de plus, le 5-fluorouracile augmente, dans certaines conditions, le niveau de la TPO « induit » par l'hydrocortisone [86]. Signalons aussi que Harel et coll. [87] ont observé une persistance de la synthèse du RNA dépendant du DNA dans le foie de rats traités par l'actinomycine.

Il sera donc, probablement, plus efficace d'aborder ces problèmes à l'aide d'autres méthodes ; en particulier, comme nous disposons d'une technique de purification importante de la cystathionase, il sera extrêmement utile de rechercher si les traitements (thyroïdectomie, carence en vitamine B_6, injections de substrats ou d'hormones...) qui, imposés aux animaux, modifient l'activité de l'enzyme, affectent la vitesse d'incorporation d'acides aminés marqués dans l'apoenzyme.

Nous présentons ici un tableau (*Tableau XXX*) qui regroupe quelques-unes des modifications observées sur l'activité d'enzymes souvent cités dans ce travail.

Un autre résultat particulièrement net obtenu au cours de cette étude concerne l'action de l'éthionine sur l'activité de la cystathionase du foie de rat mâle et femelle. Cette substance, considérée comme un inhibiteur de la synthèse protéique, a un effet quelque peu surprenant sur la cystathionase dont elle augmente le niveau. Cette action se manifeste seulement *in vivo ; in vitro,* l'éthionine ne provoque aucune modification de l'activité de la cystathionase. Nous avons envisagé plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène et nous avons retenu les trois suivantes : une action par l'intermédiaire d'un substrat (homosérine) de l'enzyme, une action sur la vitesse de synthèse de l'apocystathionase, et enfin un passage du cofacteur de la fraction particulaire dans la fraction soluble.

L'action de l'éthionine par l'intermédiaire de l'homosérine nous a été suggérée par la présence de cet acide aminé décelé parmi les

TABLEAU XXX : Influence de divers facteurs sur l'activité de quelques enzymes du foie de rat

Enzymes cytoplasmiques	Substrat * à R N	Surrénalectomie	Hydrocortisone	Substrat * à R S	Thy **	Tc **	Jeûne
TPO	↗	↘	↗	↗		Pas d'effet	
TCT	↗	↘	↗	Pas d'effet	↗	↘	↗
G6P		Effet variable selon régime	↗		↗		↗
G-6P-Dh					↗	↘	
Cyst	↗	Effet variable selon régime	↗	Pas d'effet	↘	↗	↗

↗ = activité enzymatique augmentée par le traitement ; ↘ activité enzymatique diminuée par le traitement — * = substrat injecté à des rats normaux (RN) ou à des rats surrénalectomisés (RS).

** Thy = rats thyrotoxiques — Tc = rats thyroïdectomisés — TPO = tryptophane pyrrolase — TCT = transaminase tyrosine-acide α-cétoglutarique — G6P = glucose-6-phosphatase — G-6P-Dh = glucose-6-phosphatase déshydrogénase — Cyst = cystathionase.

acides aminés libres du foie de rats traités à l'éthionine : il semble donc qu'il y ait, à partir de cette substance ou d'un de ses dérivés, peut-être la S-adénosyl-éthionine, production d'homosérine, bien que jusqu'ici le mécanisme de cette formation n'ait pas été déterminé, chez les animaux.

Les résultats des expériences, au cours desquelles nous avons surimposé un traitement à la puromycine ou une thyrotoxicose à un traitement par l'éthionine, permettent de penser que l'éthionine agirait au moins en partie en augmentant la vitesse de synthèse de l'apoenzyme. Il n'est pas exclu que l'éthionine ait une double action, et par l'intermédiaire des substrats, et sur la vitesse de synthèse de l'enzyme.

Nous avons aussi formulé l'hypothèse d'une « délocation », sous l'effet de l'éthionine, du coenzyme (PLP) des fractions particulaires d'un homogénat de foie de rat, ce qui augmenterait le taux de PLP de la fraction soluble. Cette hypothèse est suggérée par les constatations de FEIGELSON et GREENGARD [78] d'une part, par celles rappelées par STEKOL [58] d'autre part. Selon les premiers, l'augmentation de l'activité de la TPO, enzyme de la fraction soluble du foie de rat, par le tryptophane, serait due à un passage de l'hématine,

coenzyme de la TPO, des fractions particulaires dans la fraction soluble, donc, en fait, à un accroissement dans celle-ci du taux de coenzyme. De plus, d'après diverses observations regroupées par STEKOL, l'éthionine provoque un gonflement des mitochondries et peut-être aussi des microsomes, ce qui entraînerait des altérations des membranes de ces particules et des libérations de diverses substances telles que l'hématine, le PLP et le NADP. Cette dernière observation, à savoir une « délocation » du NADP des fractions particulaires sous l'influence de l'éthionine, expliquerait peut-être l'augmentation d'activité, récemment observée, de la glucose-6-phosphate déshydrogénase du foie de rats traités à l'éthionine [80]. Il est de quelque intérêt de souligner que la cystathionase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase sont, jusqu'ici, les seuls enzymes dont les niveaux sont accrus par l'éthionine.

Le mécanisme d'action de l'éthionine sur la cystathionase mérite donc d'être étudié de manière plus approfondie. Pour l'éclaircir, il nous faudra d'abord doser le taux de PLP de la fraction soluble du foie d'animaux normaux et d'animaux traités à l'éthionine, afin de voir si, réellement, l'éthionine provoque une « délocation » du coenzyme. De plus, nous mesurerons la vitesse d'incorporation d'un acide aminé marqué dans la protéine enzymatique chez des rats normaux et chez des rats traités à l'éthionine. Il sera aussi intéressant de vérifier si l'actinomycine modifie l'action de l'éthionine et de rechercher quelle est l'origine de l'homosérine dans le foie de rats traités à l'éthionine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Chatagner (F.), Jollès-Bergeret (B.) et Labouesse (J.). — *Compt. Rend.*, 251 (1960) 3097.

2. Chatagner (F.), Labouesse (J.), Trautmann (O.) et Jollès-Bergeret (B.). — *Compt. Rend.*, 253 (1961) 742.

3. Jollès-Bergeret (B.), Brun (D.), Labouesse (J.) et Chatagner (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 397.

4. Loiselet (J.) et Chatagner (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 33.

5. Cavallini (D.), Mondovi (B.), Marco (C. de) et Scioscia-Santoro (A.). — *Enzymologia*, 24 (1962) 253.

6. Cavallini (D.), Mondovi (B.) et Marco (C. de). — Dans « Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis », édité par E.E. Snell, P.M. Fasella, A.E. Braunstein et A. Rossi Fanelli, publié par Pergamon Press, New York, 1963, p. 361.

7. Binkley (F.) et Okeson (D.). — *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 273.

8. Binkley (F.). — *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 287.

9. Binkley (F.) et Olson (C.K.). — *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 881.

10. Matsuo (Y.) et Greenberg (D.M.). — *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 545, 561 ; 234 (1959) 507, 516.

11. Knox (W.E.). — Dans « Physiological Adaptation », édité par C.L. Prosser, Washington, 1958, p. 107.

12. Knox (W.E.) et Behrman (E.J.). — *Annual Review of Biochemistry*, 28 (1959) 223.

13. Ashmore (J.) et Weber (G.). — *Vitamins and Hormones*, 17 (1959) 91.

14. Tepperman (J.) et Tepperman (H.M.). — *Pharmacological Reviews*, 12 (1960) 301.

15. Advances in Enzyme Regulation, édité par G. Weber, publié par Pergamon Press, New York ; volume I, 1963 ; volume 2, 1964.

16. Chatagner (F.), Jollès-Bergeret (B.) et Labouesse (J.). — *Revista Espagnola de Fisiologia*, 16 (1960) suppl. II, 225.

17. Freedland (R.A.) et Harper (A.E.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1041.

18. Cerecedo (L.R.), Foy (J.R.) et Renzo (E.C. de). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 17 (1948) 397.

19. Lin (E.C.C.) et Knox (W.E.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1186.

20. Gavosto (F.), Pilari (A.) et Brusca (A.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 250.

21. Jollès-Bergeret (B.), Labouesse (J.) et Chatagner (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 51.

22. Kvam (D.C.) et Parks (R.E. Jr). — *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 2893.

23. Gaetani (S.) et Spadoni (M.A.). — *Nature*, 191 (1961) 1296.

24. Weber (G.), Banerjee (G.) et Bronstein (S.B.). — *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 4 (1961) 332.

25. Gorski (J.), Aizawa (Y.) et Mueller (G.C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 95 (1961) 508.

26. Weber (G.) et Singhal (R.L.). — *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 521.

27. Selim (A.S.S.M.) et Greenberg (D.M.). — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1474.

28. Thompson (R.Q.) et Guerrant (N.B.). — *J. Nutrition*, 50 (1953) 161.

29. Johnson (R.M.), Albert (S.) et Reeves (A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 88 (1955) 594.

30. Russel (J.). — *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 457.

31. Friedemann (T.E.) et Haugen (G.E.). — *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 415.

32. Lowry (O.H.), Rosebrough (N.J.), Farr (A.L.) et Randall (R.J.). — *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.

33. Goswami (M.N.D.), Robblee (A.R.) et Mac Elroy (L.W.). — *J. Nutrition*, 68 (1959) 671.

34. Schimke (R.T.). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 459.

35. Braunstein (A.E.) et Azarkh (R.M.). — *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 71 (1950) 93 ; *C.A.*, 44 (1950) 7900 *b*.

36. Meister (A.), Morris (H.P.) et Tice (S.V.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82 (1952) 301.

37. Greengard (O.) et Gordon (M.). — *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3708.

38. Gunsalus (I.C.) et Smith (R.A.). — Dans « Methods in Enzymology », édité par S.P. Colowick et N.O. Kaplan, publié par Academic Press, New York, vol. III (1957) page 963.

39. Chatagner (F.). — Résultats non publiés.

40. Knox (W.E.). — *J. Expt. Pathol.*, 32 (1951) 462.

41. Knox (W.E.), Auerbach (V.H.) et Lin (E.C.C.). — *Physiological Reviews*, 36 (1956) 164.

42. Knox (W.E.) et Lin (E.C.C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 85.

43. Dietrich (L.S.). — *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 79.

44. Goldstein (L.), Knox (W.E.) et Behrman (E.J.). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2855.

45. Sayre (F.W.), Jensen (D.) et Greenberg (D.M.). — *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 111.

46. Cantero (A.) et Weber (G.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 618.

47. Willmer (J.S.) et Foster (T.S.). — *Canadian J. Biochem. Physiol.*, 40 (1962) 961.

48. Schimke (R.T.). — *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1012.

49. Kenney (F.T.). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3495.

50. Chatagner (F.), Jollès-Bergeret (B.) et Trautmann (O.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 744.

51. Jollès-Bergeret (B.), Labouesse (J.) et Chatagner (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 61.

52. Chatagner (F.). — *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1963.

53. Rosen (F.) et Milholland (R.J.). — *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3730.

54. Smith (J.D.) et Dunn (D.B.). — *Biochem. J.*, (1959) 294.

55. Nemeth (A.W.). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3703.

56. Schimke (R.T.), Sweeney (W.), Berlin (C.M.). — *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 15 (1964) 214 ; *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 322.

57. Simpson (M.V.), Farber (E.) et Tarver (H.). — *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 81.

58. Stekol (J.A.). — *Advances in Enzymology*, 25 (1963) 369.

59. Dyer (D.M.). — *J. Biol. Chem.*, 124 (1938) 619.

60. Lee (N.D.) et Williams (R.H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 698.

61. Farber (E.) et Corban (M.S.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 625.

62. Natori (Y.). — *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2075.

63. Rosen (F.) et Nichol (C.A.). — *Vitamins and Hormones*, 21 (1963) 135.

64. Stekol (J.A.) et Weiss (K.). — *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 577.

65. Stekol (J.A.), Weiss (K.) et Weiss (S.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 2303.

66. Kun (E.). — Dans « Metabolic Pathways », édité par Academic Press, N.Y., vol. II (1961) p. 237.

67. Chatagner (F.). — *Nature*, 203 (1964) 1177.

68. Matsuo (Y.) et Greenberg (D.M.). — *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 547.

69. Parks (L.W.) et Schlenk (F.). — *Archiv. Biochem. Biophys.*, 75 (1958) 291.

70. Awapara (J.). — *Archiv. Biochem. Biophys.*, 19 (1948) 172.

71. Schlenk (F.). — Communication personnelle à F. Chatagner (1964).

72. Gjessing (L.R.). — *Scand. J. Chim. Lab. Invest.*, 15 (1963) 479.

73. Selin (A.S.S.M.) et Greenberg (D.M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 211.

74. Freedland (R.A.) et Avery (E.H.). — *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 3357.

75. Pitot (H.C.), Potter (V.R.) et Morris (H.P.). — *Cancer Research*, 21 (1961) 1001.

76. Grillo (M.A.) et Fossa (T.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, 40 (1964) 1114 ; *C.A.*, 62 (1964) 2137 f.

77. Chatagner (F.). — *Biochim. Biophys. Acta.*, 81 (1964) 400.

78. Feigelson (P.) et Greengard (O.). — *Nature*, 190 (1961) 446.

79. Chatagner (F.) et Trautmann (O.). — *Nature*, 200 (1964) 75.

80. Hsien-Gieh Sie et Hablanian (A.). — *Nature*, 205 (1965) 1317.

81. Hoch (F.L.). — *Physiol. Reviews*, 42 (1962) 605.

82. Rivlin (R.S.) et Levine (R.J.). — *Endo.*, 73 (1963) 103.

83. Glock (G.E.) et Maclean (P.). — *Biochem. J.*, 61 (1955), 390.

84. Lin (E.C.C.), Civen (M.) et Knox (W.E.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1183.

85. Garren (L.D.), Howell (R.R.), Tomkins (G.M.) et Crocco (R.M.). — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 52 (1964) 1121.

86. Rosen (F.), Raina (P.N.), Milholland (R.J.) et Nichol (C.A.). — *Science*, 146 (1964) 661.

87. Harel (L.), Harel (J.), Boer (A.), Imbenotte (J.) et Carpeni (N.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 87 (1964) 212.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 1

Première partie
Techniques

Chapitre I. — Traitement des animaux 7
1) *Régimes alimentaires auxquels sont soumis les animaux* 7
2) *Ablations de certaines glandes endocrines* 9
3) *Injections de diverses substances* 9

Chapitre II. — Mesure des activités enzymatiques 12
1) *Préparation des extraits enzymatiques* 12
2) *Mesure de désulfuration* 12
3) *Mesure de désamination* 15
4) *Dosage des protéines* 18
5) *Dénaturation thermique* 18

Remarques sur l'interprétation des résultats 19

Deuxième partie
Résultats

Chapitre I. — Influence des régimes alimentaires des animaux 22
1) *Régimes du commerce* 22
2) *Régimes synthétiques* 25
3) *Régime synthétique enrichi en méthionine* 27
4) *Régime synthétique enrichi en cystine* 27

Chapitre II. — Influence de la pyridoxine 29
1) *Régime carencé en vitamine* B_6 29
2) *Injections de pyridoxine* 30

Chapitre III. — Influence de quelques hormones et des substrats de l'enzyme . 38

Influence des hormones surrénaliennes 39
1) *Injections d'hydrocortisone* 39
2) *Surrénalectomie* 39

Influence des hormones thyroïdiennes 42
1) *Injections de puromycine* 42
2) *Influence d'une carence en pyridoxine* 44

Influence des substrats 45
1) *Injection de L-cystéine* 45
2) *Injection de DL-homosérine* 46
3) *Injection de L-méthionine* 46
4) *Injection d'autres acides aminés* 48
5) *Injection de DL-homosérine à des rats surrénalectomisés* 49

Chapitre IV. — Influence d'injections d'antimétabolites 51
1) *Injections de 8-azaguanine* 51
2) *Injections de 5-fluorouracile* 52

Chapitre V. — Influence de l'éthionine 55
Action de l'éthionine « *in vivo* » 55
Action de l'éthionine « *in vitro* » 58
Effets comparés du jeune et de l'éthionine 60
Comportement de l'enzyme extrait de foie de rats traités à l'éthionine . . 62
Injection d'éthionine à des rats surrénalectomisés 64
Action de l'éthionine par l'intermédiaire des substrats 65
Action de l'éthionine par l'intermédiaire du cofacteur 67
Injection d'éthionine à des rats injectés à la puromycine ou à la thyroxine 71

Conclusions 75

Bibliographie 84

Imprimerie R. Foulon & Cie, 29, rue Deparcieux, Paris xiv^e

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Action de l'actinomycine sur la synthèse de l'ARN

Vu et approuvé :
Paris, le 15 juillet 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN ROCHE